



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Detección de *Bartonella bacilliformis* en Lutzomyias de
Cusco por el método de PCR en tiempo real**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctora en Ciencias de la
Salud

AUTOR

Sofía Esther ROMERO MEDEROS

ASESOR

Ricardo TERUKINA TERUKINA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Romero S. Detección de *Bartonella bacilliformis* en Lutzomyias de Cusco por el método de PCR en tiempo real [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2017.

821



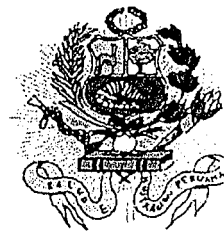
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE MEDICINA

SECCIÓN DOCTORAL

Vice Decanato de Investigación y Unidad de Post Grado



Revisado por:

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

En la ciudad de Lima, a los diecinueve días, del mes de Junio del año dos mil diecisiete, siendo las 10.00am., ante el Jurado de Sustentación, bajo la Presidencia de la **Dra. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI VDA. DE PELLA**, y los Miembros del mismo, los Doctores:

DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI VDA. DE PELLA
DRA. HILDA MARÍA SOLIS ACOSTA
DR. JUAN TAKANO MORÓN
DR. SERGIO GERARDO RONCEROS MEDRANO
DR. RICARDO TERUKINA TERUKINA

PRESIDENTA
MIEMBRO
MIEMBRO
MIEMBRO
ASESOR

La postulante al Grado de Doctor en Ciencias de la Salud, es Magíster en Ciencias en el Programa: **Enfermedades Infecciosas Emergentes**, Doña **Sofía Esther Romero Mederos**, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su Tesis titulada: **"Detección de Bartonella bacilliformis en Lutzomyias de Cusco por el método de PCR en Tiempo Real"** para optar el Grado Académico de Doctor.

Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, después de la cual obtuvo la siguiente calificación **B Muy Bueno 17**, a continuación la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad de Medicina, proponga que se le otorgue a la Magister **Sofía Esther Romero Mederos**, el Grado Académico de **Doctor en Ciencias de la Salud**.

Se expide la presente Acta en tres originales y siendo las 11.20 am se da por concluido el acto académico de sustentación.

DRA. HILDA MARÍA SOLIS ACOSTA
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

DR. JUAN TAKANO MORÓN
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

DR. SERGIO GERARDO RONCEROS MEDRANO
 MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

DR. RICARDO TERUKINA TERUKINA
 ASESOR DE LA TESIS DE SUSTENTACIÓN

DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI VDA. DE PELLA
 PRESIDENTA DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

Tabla de contenido

Título.....	1
Tabla de contenido.....	2
Dedicatoria.....	4
Resumen.....	7
Objetivos.....	10
Antecedentes.....	12
Historia de la Bartonelosis	14
Aspectos clínicos de la bartonelosis.....	15
La fiebre de la Oroya.....	16
Verruga Peruana.....	16
Infección asintomática.....	18
Tratamiento de acuerdo al MINSA.....	18
Estudios epidemiológicos.....	20
Diagnóstico.....	21
Datos históricos entomológicos.....	23
Descripción y biología de los Flebotominos.....	25
Información molecular.....	27
Distribución de los Flebotominos.....	28
Incriminación vectorial.....	31
Prevención y control.....	32
Principios del PCR en tiempo real.....	32

Fundamento de PCR	32
Análisis del producto de la reacción.....	33
PCR en tiempo real.....	33
Diseño de cebadores.....	33
Sondas taqman.....	34
Gen del citrato sintetasa.....	34
Materiales y métodos.....	36
Lugar del estudio.....	36
Obtención de muestras de Lutzomyias.....	37
Aislamiento del DNA usando el kit Qiagen Dneasy Tissue kit.....	38
Detección de ADN con electroforesis.....	42
PCR en tiempo real usando el termociclador ABI 5700.....	43
PCR en tiempo real usando el termociclador Lightcycler 1.2.....	47
PCR en tiempo real usando el termociclador Chromo4.....	49
Resultados.....	53
Discusión.....	66
Conclusiones.....	73
Recomendaciones.....	74
Apéndice.....	75
Glosario.....	89
Bibliografía.....	90
Lista de Figuras	
Figura 1. Puente Verrugas.....	14

Figura 2. Cultivo en medio bifásico F-1 modificado.....	22
Figura 3. <i>Lutzomyia verrucarum</i> . (Cortesía Dr. Phillip Lawyer).....	26
Figura 4. Distribución de <i>Lutzomyia verrucarum</i>	28
Figura 5. Distribución de Bartonelosis en el Perú.....	29
Figura 6. Distribución de <i>Lutzomyia peruensis</i>	30
Figura 7. Poblados estudiados – Google Earth	36
Figura 8. Pobladores de Cusipata. (Cortesía Dr. Richard Andre).....	37
Figura 9. Muestras evaporando el alcohol.....	38
Figura 10. Machacado de las muestras.....	39
Figura 11. Coloración Giemsa de cultivo T-J.....	42
Figura 12. Resultado con ruido del PCR en tiempo real usando el termociclador ABI 5700.....	45
Figura 13. Resultados de controles negativos.....	46
Figura 14. Corrida de estándares con el Taqman 7300.....	47
Figura 15. PCR tiempo real usando reactivos Taqman en el Lightcycler 1.2.....	48
Figura 16. Resultados con reactivos usados previamente en el Lightcycler 1.2.....	49
Figura 17. Corrida electroforética de productos de controles en PCR tiempo real.....	57
Figura 18. Protocolo de ciclaje inicial.....	59
Figura 19. Protocolo de ciclaje final.....	60
Figura 20. Punto de corte a 1pg.....	61
Figura 21. Punto de corte a 100fg.....	62
Figura 22. Curva estándar.....	63

Lista de Tablas

Tabla 1. Norma técnica para el tratamiento de bartonelosis.....	20
Tabla 2. Resultados de los controles.....	55
Tabla 3. Resultados para los Valores predictivos.....	56
Tabla 4. Tabla de resultados.....	75

Lista de Graficas

Gráfica 1. Resultados de muestras de Casa #2.....	64
Gráfica 2. Distribución estacional del estudio en Cusco.....	65
Gráfica 3. Recolección total de muestras de Cusco.....	69
Gráfica 4. Resumen de muestras procesadas vs. Capturadas.....	69
Gráfica 5. Recolección de Lutzomyias en Cusipata. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez.....	71
Gráfica 6. Recolección de Lutzomyias en Parapujio. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez.....	71
Gráfica 7. Recolección de Lutzomyias en Moccoraize. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez	

Dedicatoria

A mi familia, profesores y amigos que con su guía y su apoyo moral fueron los artífices para poder concluir esta tesis. Dando así el paso final a esta etapa de mis estudios.

Resumen

Esta investigación fue diseñada para fortalecer la hipótesis que incrimina a los flebotominos como vectores de la *Bartonella bacilliformis*, organismo que causa la bartonelosis aportando nuevas evidencias en ese sentido. El objetivo de este estudio es determinar el porcentaje de Lutzomyias naturalmente infectadas con *Bartonella bacilliformis* usando la técnica de PCR en tiempo real. Esta prueba fue desarrollada en un trabajo anterior para poder detectar cantidades tan pequeñas como 100fg de ADN de *Bartonella* en Lutzomyias. Se utilizó el protocolo anterior usando primers del gen del citrato sintetasa como blanco. En este estudio se estandarizo la prueba en un equipo de tiempo real diferente y se refino el protocolo para obtener mejores resultados.

Las *Lutzomyia verrucarum* se encuentran distribuidas en las zonas endémicas de bartonelosis en especial en los alrededores de Caráz, Ancash, Perú. Sin embargo en este estudio se procesaron muestras de la zona epidémica de Cusco, zona donde se encuentra distribuida la especie *Lutzomyia peruensis*. Se usó las *Lutzomyia peruensis* hembras sin alimentar en grupos de cinco (pool) para extraer el ADN. Los resultados obtenidos de las 627 muestras procesadas, 45 muestras fueron positivas que equivale a un rango de infección de 7.18%. La sensibilidad de la prueba fue 100% y especificidad fue de 95.50% basada en las pruebas usando muestras controles. Se concluye que este método tiene la sensibilidad y especificidad necesaria para detectar *B. bacilliformis* en *Lutzomyias* permitiéndonos determinar la verdadera proporción de infección en estos vectores en áreas endémica y epidémicas de Perú. Este estudio también nos da

más evidencia para incriminar a las Lutzomyias, en este caso a la especie *Lutzomyia peruensis* como vector de la bartonelosis.

Este trabajo de tesis uso las muestras obtenidas de la zona epidémica de Cusco en los poblados de Parapujio, Mocoriase y Cusipata para obtener el rango de infección y obtener la variación estacional de la infección de las Lutzomyias con *Bartonella bacilliformis* de esa área. La importancia de saber la estación o mes donde hay mayor número de vectores infectados nos dará una herramienta epidemiológica para poder discriminar cuando es el momento oportuno de fumigación. Se realizó un estudio de estacionalidad luego del brote epidémico en Cusco en 1999, las muestras procesadas son de la recolecta realizada durante los años 2001 al 2003.

Abstract

This research was designed to strengthen hypothesis that phlebotomines are vectors of *Bartonella bacilliformis*, the organism that causes bartonellosis. The objective of this study is to determine the percentage of *Lutzomyias* collected in an epidemic setting that are naturally infected with *Bartonella bacilliformis* using a real time PCR technique. As demonstrated in prior research this technique is able to detect minute *Bartonella* DNA in Lutzomyias for example 100fg. As in the previous protocol we used primers for citrate synthase gene as a target. In this study different equipment for real time testing was used and the protocol was standardized for better results.

Lutzomyia verrucarum are distributed in the areas endemic for bartonellosis such as the vicinity of Caraz, Ancash, Peru. In this study, samples were collected from the epidemic area in Cusco, where *Lutzomyia peruensis* are

also widely distributed. *Lutzomyia peruensis* females that had not fed were pooled in groups of five and DNA was extracted. Of 627 processed specimens 45 (7.18%) samples were positive. Based on testing of sample controls this method has the required sensitivity (100%) and specificity (95.50%) to detect *B. bacilliformis* in *Lutzomyias* and allows us to determine the true rate of infection of these vectors in both endemic and epidemic settings in Peru. These results provide additional evidence to incriminate *Lutzomyias*, in this case the species *Lutzomyia peruensis*, as the vector of bartonellosis.

The seasonality research collected samples between 2001 and 2003 in the villages of Cusipata, Mocorise, and Parapujio near Cusco following the 1999 epidemic of bartonellosis. The samples were analyzed to obtain the percentage of *Lutzomyias* infected with *Bartonella bacilliformis* and to determine the seasonal variation of infection in the area. Knowing the season or month with the greatest number of infected vectors is important in order to determine the best time to fumigate.

Objetivos

El objetivo de este estudio es determinar el porcentaje de *Lutzomyias* naturalmente infectadas con *Bartonella bacilliformis* usando la técnica de PCR en tiempo real, que es una prueba rápida y sensible para procesar muestras de campo del área de Cusco en el distrito de Urcos, localidades de Cusipata, Parapujio y Moccorise.

El objetivo específico de interés sanitario es determinar la estación del año y de preferencia el mes del año que se encuentra el mayor número de lutzomyas

infectadas para así determinar la época más relevante para realizar las fumigaciones para evitar futuros brotes.

Un objetivo complementario es la validación de la prueba con las adaptaciones correspondientes con un nuevo equipo y reactivos similares a la prueba validada en el primer estudio.

Necesidad de estudio

Esta nueva herramienta de diagnóstico fue ideada tanto para trabajo de campo como para el laboratorio. Se preveé que servirá para el análisis epidemiológico y así poder observar la dinámica de la transmisión de bartonellosis. De esta manera se sabrá más sobre el ciclo de infección natural en las Lutzomyias en la zona de estudio, las variaciones según las estaciones y el mecanismo de transmisión por la picadura de estos vectores en una nueva zona de estudio, ya que muy poca información ha sido confirmada. Estos datos ayudaran a obtener una mejor planificación y dirección de los recursos para prevenir la transmisión de *Bartonella bacilliformis* en humanos en todas las áreas afectadas por esta enfermedad. En el estudio anterior se analizó muestras del área de Caráz donde se pudo obtener el dato que en los meses de marzo se observa el mayor índice de infección de Lutzomyias con *Bartonella*, por lo que se recomienda realizar las fumigaciones del vector en ese mes o semanas previas (Romero 2005). Se espera poder determinar el mes con mayor infección en la zona de Cusco para así recomendar cuando fumigar en estas localidades y contribuir con información más precisa de prevención. Hasta la fecha esta zona aun presenta casos de enfermedad aguda, que se puede constatar en los reportes de los boletines epidemiológicos del MINSA.

Este protocolo fue elaborado para detectar cantidades pequeñas de ADN de *Bartonella bacilliformis* como lo es detectarla en muestras de *Lutzomyias*. El PCR en tiempo real es una prueba muy sensible y refleja con más precisión el rango de infección en poblaciones afectadas por esta enfermedad en áreas epidémicas de Cusco. Este proyecto de investigación nos da una aproximación más real del verdadero riesgo de infección humana en las áreas endémicas y epidémicas.

Este estudio de investigación se ha financiado en su totalidad por la Universidad de Servicios Uniformados de las Ciencias de Salud (USUHS) de Bethesda, Maryland y se ha usado las instalaciones y los equipos del instituto NAMRU-6 (U.S. Naval Medical Research Unit No. 6) para todas las extracciones de ADN y para los ensayos preliminares. Se usó el Chromo4 del departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para las pruebas de PCR tiempo real en todos los pools de muestras evaluados. Se reitera el agradecimiento a dichas instituciones ya que sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

Antecedentes

La bartonelosis es una enfermedad con muchos antecedentes históricos por lo que se ha estudiado desde la época de la colonia. La bartonelosis también es conocida como la Verruga Peruana y Fiebre de la Oroya este último nombre por el brote epidémico más grande reportado que se produjo al construir el puente del tren a la Oroya. La bartonelosis es una enfermedad infecciosa causada por un bacilo pleomorfo pequeño de 0.2 – 0.5 por 1.0 μm . A pesar que es de difícil coloración es un Gram-negativo de la familia de las α -proteobacteria llamado

Bartonella bacilliformis. Esta bacteria es intracelular facultativa, móvil debido a sus flagelos unipolares. Esta enfermedad que en la actualidad rara vez es mortal, es una enfermedad infecciosa que normalmente se encuentra en zonas de escasos recursos en las comunidades de los Andes de Perú, Ecuador y Colombia (Alejandro, 1995). Esta enfermedad generalmente se presenta en dos fases pero existen otras que más adelante se estarán detallando. La primera fase es una enfermedad febril aguda también conocida como la Fiebre de la Oroya, esta es la fase que puede ser fatal si no se recibe tratamiento. La segunda fase se caracteriza por presentar lesiones cutáneas llamadas hemangiomas que regresan en varios meses sin dejar una cicatriz. Esta fase eruptiva crónica o la fase verrucosa es la más común y se conoce como la Verruga Peruana.

La información observacional y experimental recolectada sugiere que la bartonelosis es transmitida a través de un vector, el género *Lutzomyia*. Estos insectos son también llamados comúnmente como titiras o manta blanca. La enfermedad normalmente ocurre en elevaciones entre 800 y 2800 metros, esta distribución corresponde con ciertas especies de *Lutzomyias*. Los recientes brotes han ocurrido por encima de 3000 metros sobre el nivel del mar, como también en zonas de altitud promedio de 1500 metros como es la zona de Chachapoyas (Ellis et al. 1999; Kosek et al. 2000). Esto nos hace pensar que cambios climáticos pueden estar afectando la envergadura tradicional de esta enfermedad. La bartonelosis afecta a una población endémica extensa haciendo que esta enfermedad sea un gran problema de salud para el Perú. Las lluvias provenientes del fenómeno del El Niño se correlacionan con un aumento de casos y severidad de la enfermedad, se sospecha como causa de estas epidemias a

este factor natural (Zhou et al 2002; Huarcaya et al. 2004). La globalización con los crecientes viajes nacionales e internacionales a zonas endémicas también pueden extender la enfermedad a las áreas no-endémicas, y ahora se tiene nuevas áreas consideradas como endémicas (Cáceres-Ríos et al. 1995; Tejada et al. 2003). Todos estos datos nos llevan a considerar a la bartonelosis como una enfermedad reemergente infecciosa.

Estudios colaterales a este buscaron el reservorio animal sin resultados positivos. Hasta la fecha no se ha encontrado reservorio animal, por lo tanto, se estima que los humanos son los únicos reservorios naturales evidentes. Por consiguiente, se piensa que el modo de transmisión es humano-flebotominohumano. Aún queda por determinar la forma de transmisión, si es mecánica o transmisión directa. Por lo que se espera que las nuevas técnicas moleculares ayuden a dar respuestas para cerrar el ciclo de transmisión. Las poblaciones de más riesgo son los niños menores de 10 años, mujeres embarazadas y los nuevos inmigrantes hacia un área endémica (Maguiña 1998).

Historia de la Bartonelosis

La bartonelosis ha causado enfermedad y muerte desde los tiempos preincas. Existe evidencia de la existencia de esta enfermedad desde la antigüedad basados en las reproducciones de personas afectadas por la verruga encontrada en huacos preincaicos (Kosek et al. 2000).

La fase aguda, o Fiebre de la Oroya, se describió durante un brote en 1870 asociada con la construcción de un ferrocarril de Lima a La Oroya. Más de 7000 obreros murieron causando mucha preocupación en la comunidad local y

científica. Debido a la gran cantidad de pacientes, se documentó muchas valiosas observaciones (Pachas 2000).



Figura 1. Puente Verrugas

La bartonelosis también se llama la enfermedad de Carrión en honor a Daniel Alcides Carrión, un estudiante de medicina que, en 1885, demostró que la fiebre de Oroya y la Verruga Peruana son fases de una misma enfermedad. Después de inocularse con la sangre proveniente de una verruga, él desarrolló la forma aguda de la enfermedad después de 21 días y murió a los 40 días posteriormente de la inoculación (Pachas 2000). Daniel Alcides Carrión dio su vida en aras del conocimiento médico. Él fue un mártir en el Perú y actualmente el 5 de octubre es el día nacional de la medicina peruana fecha en la cual se conmemora su sacrificio. Este héroe nacional está enterrado en el patio central del Hospital Dos de Mayo en un mausoleo de mármol. Este hospital fue donde estuvo internado Carrión durante su enfermedad.

Aspectos clínicos de la bartonelosis

Se piensa que el período de la incubación de bartonelosis es de tres a diez meses. Clínicamente, la infección por *Bartonella bacilliformis* se presenta en dos fases diferentes: una fase aguda manifestada por una anemia hemolítica y una fase crónica eruptiva llamada Verruga Peruana. Existen también, infecciones asintomáticas que fue comprobado en un estudio anterior donde se pudo aislar por cultivo a la *Bartonella bacilliformis* de pacientes asintomáticos (Chamberlin et al. 2002). Según varios estudios, la proporción de mortalidad en los pacientes sin tratamiento durante la fase aguda puede alcanzar hasta el 90%. Las infecciones concomitantes durante la fase aguda, puede incluir la fiebre tifoidea, la reactivación de la tuberculosis, neumocistis y otros, provocando mortalidad adicional (Maguiña 1998). En las zonas endémicas es también común la mortalidad en las mujeres embarazadas y los abortos espontáneos. Por lo que se debe considerar a las mujeres embarazadas de alto riesgo en las zona endémicas (Guimaraes et. al 2006).

Aun no se conoce las razones por las cuales existen diferentes fases que presenta esta enfermedad, se realizó un estudio para determinar si las diferencias genéticas entre las cepas determinan la forma de presentación de la enfermedad, pero no hubo diferencias significativas (Hambuch et. al 2004).

Fiebre Oroya

La fiebre de la Oroya se manifiesta como una enfermedad hemolítica aguda puede presentarse con fiebre y síntomas variados y puede caracterizarse por presentarse como una anemia leve hasta una anemia severa. Durante la fase aguda, hasta el 100% de los glóbulos rojos de la sangre pueden parasitarse y 80%

se pueden lisarse. La *Bartonella bacilliformis* es la única bacteria que se conoce que invade los glóbulos rojos humanos (Coleman & Minnick 2001). La bacteria ingresa en el eritrocito donde prolifera, y después liza la célula para invadir los eritrocitos adyacentes. Durante muchos años, investigadores pensaron que los bacilos no penetraban pero se adherían a la pared celular de las células de la serie roja. Sin embargo en 1969, Takano, usando la microscopía electrónica, demostró que las bacterias penetraban el eritrocito (Cuadra & Takano 1969). Hay evidencia preliminar que hace pensar que la *Bartonella bacilliformis* actúa con proteínas de superficie de los eritrocitos humano que funcionan como los receptores para la penetración (Buckles & McGinnis 2000).

Verruga Peruana

La fase más común que se puede observar en la población endémica es la fase eruptiva o fase verrucosa que se le llama Verruga Peruana. Normalmente esta fase ocurre de cuatro a ocho semanas después de que los síntomas que la fiebre de La Oroya se han resuelto y es caracterizada por hemangiomas (tumores vasculares benignos). Esta fase presenta una variedad de lesiones y puede ocurrir sin importar si hubo o no tratamiento con antibióticos (Velho et al. 2003). Las lesiones frecuentemente sangran espontáneamente son al parecer el resultado de inmunidad parcial a la infección (Alexander 1995). Aunque también puede deberse a la fragilidad de las verrugas y la gran vascularización que hay en ellas. Durante esta fase, las bacterias invaden las células endoteliales vasculares y como consecuencia estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos (Maguiña

1998). La fase eruptiva o verrucosa aunque no es frecuentemente severa puede durar varios meses. Normalmente las lesiones verrucosas no dejan las cicatrices.

Hay tres tipos diferentes de lesiones verrucosas:

Las lesiones **Miliares** son muy pequeñas y normalmente diseminadas. Se localizan en la dermis papilar y son las más comúnmente encontradas en las extremidades de los pacientes.

Las verrugas **Mulares** son las lesiones grandes y pueden extenderse en toda la hipodermis. Las secciones histológicas tempranas muestran proliferación de células endoteliales y macrófagos. El número de mitosis es inconstante, y el número de la mitosis se correlaciona con el tamaño de la lesión. En algunos casos, las lesiones son numerosas y son asociadas con células atípicas. Las lesiones mulares dan una imagen histológica similar a una neo formación maligna. Rara vez se encuentran linfocitos, mastocitos y células plasmáticas. La evolución de la lesión normalmente empieza con el ablandamiento y termina finalmente con la reabsorción de la lesión vascular (Maguiña 1998).

Finalmente, las lesiones **nodulares** son hipodérmicas, normalmente asintomáticas, y la mayoría de estas lesiones sanará sin tratamiento en tres a seis meses (Maguiña 1998).

La Infección asintomática

Hay también un período intermedio asintomático entre la fase aguda y crónica que varía en su duración. Se piensa que esta fase es la más importante para el ciclo de transmisión, y se cree que los portadores asintomáticos son los reservorios de la enfermedad (Maguiña 1998). En los estudios preliminares a este, se realizó cultivos a una población endémica obteniendo cultivos positivos a

personas asintomáticas (Chamberlin et al 2000). En este estudio se observó que ninguno de estos cultivos positivos de pacientes asintomáticos fueron frotis sanguíneo positivos.

Un trabajo de investigación interesante sería analizar pacientes asintomáticos en contacto a pacientes sintomáticos de esta manera detectar mayor número de potenciales reservorios. Luego darles tratamiento y poder registrar si la cantidad de casos reportados tiende a disminuir.

Tratamiento de acuerdo al Ministerio de Salud

La *Bartonella bacilliformis* es muy susceptible a los antibióticos. En Perú, el Ministerio de Salud (MINSA) usa el cloranfenicol para tratar a los pacientes adultos con las infecciones agudas (MINSA). La ampicilina se da a los niños, junto con las transfusiones de sangres para la anemia severa. Para los pacientes con verruga, se usan rifampicina y estreptomicina. El tratamiento varía, dependiendo de la situación, es decir si está en una área endémica o noendémica. El Ministerio de Salud divide el país en las regiones de Salud, y cada región tiene esquemas de tratamiento diferentes. Los regímenes de antibióticos han sido empíricamente determinados y es un punto de investigación importante pendiente de realizar. Un estudio, usando cuatro cepas de *Bartonella bacilliformis*, mostró que este organismo despliega alta susceptibilidad en vitro a la mayoría de los antibióticos (Sobraques et al. 1999). La resistencia al tratamiento tradicional es ahora más común, sobre todo en el caso de los recientes brotes epidémicos, como fue el brote del Cusco (comunicación personal, Dr. Manuel Montoya). Deben probarse nuevos esquemas del tratamiento para prevenir la resistencia y ahora se tiene un tratamiento recomendado a nivel del ministerio de salud para unificar protocolos.

Se puede observar en la tabla de la norma técnica de MINSA, norma que rige desde el 2006, que se tiene en cuenta tres poblaciones concretas, los niños y adolescentes menores de 14 años, los adultos y las mujeres gestantes.

El mecanismo de resistencia no se ha delineado todavía (Barbian & Minnick 2000). Este es un punto de investigación que también se debe trabajar para poder elaborar un esquema de tratamiento preciso. Incluso pensar en un tratamiento combinado.

GRUPO	PRIMERA LÍNEA		SEGUNDA LÍNEA	
	DROGA	DOSIS	DROGA	DOSIS
NIÑOS Y ADOLESCENTES MENORES DE 14 AÑOS (< 45 kg)	Amoxicilina/ Ácido clavulánico	40 mg/ Kg/día dividido cada 12 horas por 14 días, por vía oral. (en base a la amoxicilina)	Ciprofloxacino	10 mg/Kg/ peso/día dividido cada 12 horas por 14 días.
			Cloranfenicol	50 mg/Kg/día los 3 primeros días y luego 30 mg/Kg/día hasta completar 14 días
			Cotrimoxazol	10 mg/Kg/día fraccionado cada 12 horas por 14 días (en base al trimetoprim)
ADOLESCENTES MAYORES DE 14 AÑOS Y ADULTOS (> 45 kg)	Ciprofloxacino	500 mg cada 12 horas por 14 días, por vía oral	Amoxicilina/ Ácido clavulánico	1 gr cada 12 horas por 14 días (en base amoxicilina)
			Cotrimoxazol	800/ 160 mg cada 12 horas por 14 días.
			Cloranfenicol	50 mg/Kg/día los 3 primeros días, y luego 30 mg/Kg/día hasta completar 14 días
GESTANTE	Amoxicilina/ Ácido clavulánico	1 gr cada 12 horas por 14 días, por vía oral (en base amoxicilina)	Cloranfenicol	50 mg/Kg/día los 3 primeros días, y luego 30 mg/Kg/día hasta completar 14 días
			Cotrimoxazol	800/160 mg cada 12 horas por 14 días
			Amoxicilina	1 gr. cada 8 horas por 14 días

Tabla 1. Norma técnica MINSA 2006 para el tratamiento de bartonelosis

Estudios epidemiológicos

Los datos epidemiológicos de bartonelosis son muy limitados debido a la localización remota de los brotes. Los estudios epidemiológicos retrospectivos son normalmente basados en información obtenida de hospitales y de los archivos clínicos, puestos en correlación con la histopatología y serología. Estos métodos tienden infravalorar el espectro de los síntomas de la enfermedad y sobrestimar la

verdadera morbilidad y mortalidad (Kosek et al. 2000). En las áreas dónde la *B. bacilliformis* es endémica, como es el área de Caráz, la prevalencia de la infección está alrededor de 45% (Chamberlin et al 2000). Un estudio de la cohorte conducido en Caráz encontró una incidencia de 12.7/100 persona-años (Chamberlin et al. 2002).

Aunque los datos clínicos apoyan el importante papel de la respuesta inmune en el resultado clínico de la infección (Maguiña 1998), poco se conoce sobre las respuestas inmunológicas a la *Bartonella bacilliformis*. Unos cuantos estudios esporádicos e inéditos han analizado las respuestas inmunes a esta enfermedad. Sin embargo, ninguno probablemente fue dirigido o llevado a cabo usando las técnicas inmunológicas modernas (Maguiña 1998).

El diagnóstico

El diagnóstico de bartonelosis es difícil y son muy pocos los laboratorios que trabajan con *Bartonella*. El diagnóstico por frotis de sangre requiere experiencia y la técnica de coloración debe ser buena para encontrar las bacterias intraeritrocíticas y no confundir las precipitaciones con los cocobacilos. La infección generalmente presenta el número de reticulocitos aumentado; en la bartonelosis se encuentra frecuentemente los reticulocitos aumentados hasta en un 50%.

Los bacilos crecen lentamente en cultivo y requieren técnicas especiales que incluyen el cultivo de muestras en el medio de bifásico, el medio F-1 modificado; un agar sangre suplementado con un caldo enriquecido (Malqui et al. 2000). Este medio modificado se implementó en NAMRU-6 y demostró recuperar y conservar las cepas con mayor eficiencia que los demás medios utilizados. Estas

bacterias crecen mejor a 28°C en medio bifásico con 5-10% de sangre total de oveja y 5 ml adicionales de medio RPMI enriquecido que proporciona la humedad requerida para incubaciones largas. Los cultivos deben guardarse y revisarse todas las semanas hasta por lo menos ocho semanas para asegurar una buena proporción de recuperación. Al humedecer el medio solido con el caldo se realiza una “resiembra” que luego puede evidenciarse al observar pequeñas colonias como gotas de rocío.



Figura 2. Cultivo en medio bifásico F-1 modificado

No hay ningún medio selectivo disponible para esta bacteria; por lo tanto, las medidas de esterilidad son esenciales para evitar la contaminación.

Los tipos de especímenes que pueden usarse para confirmar un diagnóstico en los pacientes sospechosos es: suero que pueden usarse para las pruebas del serológicas como la fluorescencia Indirecto (IFI) o el Western Blot (Malqui et al. 2000 también en Gray et al 1990; Knobloch et al. 1985), sangre

citrata para el cultivo de preferencia obtenida de extracción al vacío, sangre para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y biopsias o aspirados de lesiones de la verruga (Chamberlin et al 2000; Knobloch et al. 1985). El transporte de muestras es un problema importante porque las muestras pueden tardarse hasta llegar a un laboratorio de la referencia, por lo que se sugiere utilizar sangre citrata que conserva los glóbulos rojos más tiempo que el EDTA.

Datos históricos entomológicos

Datos entomológicos llevan a sospechar que los vectores de la *B. bacilliformis* son las *Lutzomyias* y buscando corroborar esta hipótesis fue elaborado estos estudios bajo la supervisión del Dr. Richard Andre y Dr. Phillip Lawyer de la universidad de USUHS. La primera documentación escrita conocida que implica a los flebotominos como los vectores de la enfermedad de Carrión y la leishmaniasis cutánea en el Perú fue publicada por Cosme Bueno en 1764, en un periódico de Lima, Perú. Estos resultados fueron reiterados en un artículo en 1975 en la revista Ciencia (Herrer & Christensen 1975). El informe de Bueno precede a otras publicaciones que implican a este vector en la transmisión de patógeno humano por casi un siglo y un medio.

Towsend en 1913, informó que el *Phlebotomus verrucarrum* (ahora *Lutzomyia verrucarum*) era el vector de bartonelosis. En su trabajo, él eliminó cualquier otro posible vector siendo luego confirmado por Hertig en 1942. Otros científicos, Noguchi, Shannon, Battistini, Herrer y Hertig corroboraron esto después en diferentes estudios (Battistini 1925; Hertig 1942).

Battistini informó en 1925 que él había transmitido bartonelosis experimentalmente a monos Rhesus inoculándolos intradérmicamente con un homogenizado de *Lutzomyias* coleccionadas de una zona de endémica. Como este experimento no demostró la transmisión por la picadura de *Lutzomyias*, él infectó después a monos Rhesus con *Lutzomyias* presumiblemente infectadas soltándolos en una jaula con los monos. Aunque este estudio fue el primer experimento de transmisión en que la enfermedad se transmitió por otros medios que no fueran inoculación, los vectores no fueron observados para ver si picaban a los monos por lo tanto no pudo ser corroborar que la transmisión fue por la picadura de *Lutzomyias* (Battistini 1925).

Hertig y sus colaboradores en 1937 empezaron una serie de experimentos en los cuales cogieron las *Lutzomyias* y las soltaron dentro de jaulas pequeñas. Se utilizó a un mono Rhesus para este experimento colocando estas jaulas pequeñas atadas a la barriga afeitada del mono. Se infectaron varios monos con *B. bacilliformis* comprobados por cultivos de sangre, pero no se prepararon cultivos de los insectos; por consiguiente no fue posible determinar si las *Lutzomyias* estaban infectadas y cerrar el círculo de transmisión.

En estudios recientes con monos (*Aotus nancymae*) se determinó que luego de inocularlos con *B. bacilliformis* a los 7 y 21 días dieron positivo en frotis teñidos con Giemsa sin embargo todos los cultivos y PCR fueron negativos. La serología dio seroconversión en algunos monos, un mono llegó a la fase verrucosa sin embargo la histopatología no fue consistente con *B. bacilliformis*. Determinaron

que los monos pueden infectarse con *B. bacilliformis* pero aún se requiere evaluar si se pueden usar como modelo humano para bartonelosis

(Bentzel et al. 2008).

Además, existía la ligera incertidumbre acerca de si la transmisión estaba dada por la mordedura o por algunos otros medios, como por la defecación de la titira. Después, Hertig y socios aislaron lo que ellos dijeron era *B. bacilliformis* de la probóscide de dos "*Phlebotomus verrucarum*" recolectados de un foco epidémico en Huinco perteneciente al Valle de Santa Eulalia. No existían en ese entonces métodos de cultivo lo suficientemente refinados para distinguir entre *B. bacilliformis* y otras especies de *Bartonella*, en la actualidad aún no existe diferencia por el método de cultivo. Por lo tanto hoy todavía existe la pregunta acerca de si este bacilo que aislaron era el mismo patógeno que causa la enfermedad en los humanos (Hertig 1942). En esa época no se contaba con métodos moleculares, por lo que es un estudio que se debe repetir utilizando las herramientas disponibles en la actualidad.

Descripción y Biología de los Flebotominos

Los flebotominos pertenecen al Orden Díptera, Familia Psychodidae. Ellos son pequeños (2-4 mm en la longitud), son moscas delicadas con las piernas largas, delgadas y estrechas, alas puntiagudas con venación en paralelo; el cuerpo se cubre con pelo parecido a setae. En reposo, las alas se sostienen derechas en un ángulo aproximado de 60, formando un "V."



Figura 3. *Lutzomyia verrucarum*. (Cortesía Dr. Phillip Lawyer)

Estos artrópodos diminutos tienen un rango del vuelo limitado. Básicamente ellos no vuelan, ellos dan brincos. Ellos prefieren descansar en la oscuridad, en lugares húmedos como las madrigueras del animal, los agujeros del árbol, en o bajo la corteza de árboles, en las partes inferiores de hojas, bajo las piedras, en las hendiduras de piedras, etc. Aún está por determinar donde las hembras ovipositan que sería un gran hallazgo para tener una nueva herramienta para la prevención de la enfermedad. Debido a su pequeño tamaño, ellos pueden atravesar los huecos de una malla usada para evitar picaduras de un mosquito común.

La mayoría de estos insectos antropofílicos se alimentan al crepúsculo y durante las horas de la tarde, pero algunas especies también morderán durante el día si se les perturba en su sitio de descanso. Algunos moscos son antropofílicos como son las especies *Lutzomyia verrucarum* y *Lutzomyia peruensis*, estos últimos son los vectores sospechosos recolectados en este estudio, las hembras son endofágicas y estas entran en las moradas humanas dónde ellas pican a los ocupantes y se van o descansan adentro de las casas

(Hertig 1942 también en Abogado & Perkins 2000; Gupta et al. 2003).

La identificación de las especies de *Lutzomyias* en el Perú se hacen en base a claves internacionales ya que no hay clave nacional de ningún autor peruano, pero cualquier entomólogo con experiencia puede identificar las especies basándose en claves extranjeras en las que las especies peruanas están comprendidas, existe la escuela brasileña o la americana, en el NAMRU-6, se usa la clave Americana o sea la de Young & Duncan 1994. (Comunicación personal del Entomólogo Roberto Fernández)

Información molecular de las *Lutzomyias*

Los datos moleculares disponibles para las *Lutzomyias* son escasos, a pesar que este género de mosquito también se le implica en la transmisión de leishmaniasis en el Nuevo Mundo. En una revisión de las relaciones genéticas entre los grupos de la especie dentro del género *Lutzomyia* (Torgenson et al. 2003) declaró que: “La estructura de la variación genética entre las especies analizadas indican una relación genética más íntima entre los miembros de un grupo morfológico que entre los miembros de grupos diferentes.”

Se tuvo que utilizar la información disponible más relevante a nuestra realidad. La mayoría de la información molecular encontrada se refiere a la *Lutzomyia longipalpis*, una especie común en Brasil, una de las especies trasmisora de leishmaniasis en esta zona ya que no se encontró ninguno dato de *Lutzomyia verrucarum* o *L. peruensis*. Se realizó una búsqueda en BLAST de la página web de GeneBank donde está publicado la mayoría de datos disponibles para otras especies de titiras como son de los de *Lutzomyia longipalpis* para diseñar los cebadores para la prueba de PCR. La idea es incluir la información

Sin embargo, diferencias entre la distribución de los brotes de la enfermedad y la distribución de *Lutzomyia verrucarum* hicieron pensar en la existencia de vectores secundarios en las áreas dónde *Lutzomyia verrucarum* no está presente (Ellis et al. 1998).

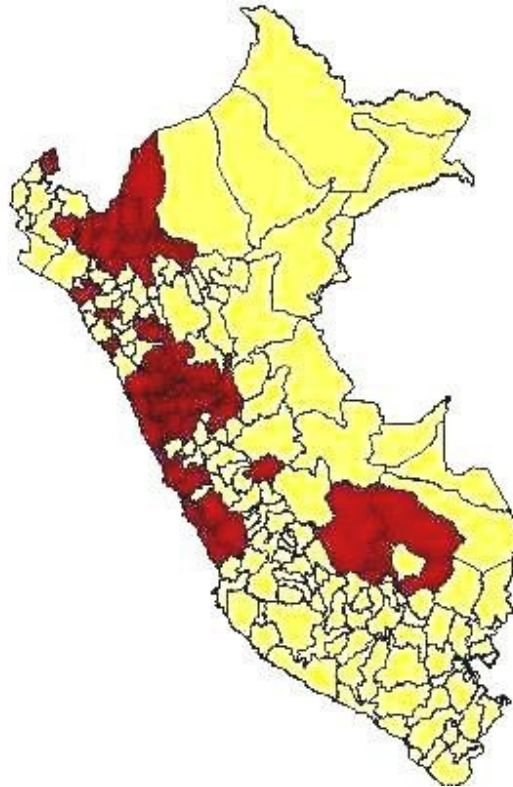


Figura 5. Distribución de Bartonellosis en el Perú.

Esto fue más evidente en 1997 cuando hubo una epidemia de bartonelosis en el departamento de Cusco dónde la *L. verrucarum* está ausente y la más predominante y única especie de manta blanca antropofílica descrita era la *L. peruensis* (Cáceres 1997; Ellis et al. 1998). Si se contrarestamos la información de los casos de bartonelosis contra la distribución de las *L. verrucarum* encontramos coincidencia con la distribución de *L. peruensis*.



Figura 6. Distribución de *Lutzomyia peruensis*

Los factores de riesgo para adquirir la bartonelosis en las áreas endémicas incluyen la asociación con las picaduras *Lutzomyias* alrededor de las viviendas de los humanos. Debido al estrato socio-económico a la cual pertenece la población en las áreas endémicas, las casas del área del estudio son de construcción de adobe, generalmente tienen una sola habitación, el piso es de tierra, y no tienen vidrios en las ventanas permitiendo el acceso libre para que entren todo tipo de dípteros. Estas casas están normalmente a unos cuantos metros de sus chacras, cerca de sus animales dónde la mosca puede estar en abundancia descansando y reproduciéndose. Otras actividades que son factores de riesgo incluyen tomar una siesta cerca o en la chacra o trabajar en sus tierras desempeñando actividades agrícolas después del crepúsculo exponiéndose a picaduras de las

titiras. Sin embargo existe más transmisión intradomiciliaria que extradomiciliaria (Maguiña, 1998).

El hábitat donde se reproducen las *Lutzomyias* es básicamente desconocida en Perú y existe una extensa investigación para localizar los sitios de desarrollo de los estadios inmaduros. Obtener esta información sería útil para elaborar las estrategias para el control del vector. La bartonelosis humana tiene una transmisión estacional, la mayoría de los casos son reportados entre los meses de enero a junio cuando la lluvia es mayor, en zonas de Ancash área endémica (Pachas 2000). El estudio actual mira la relación entre el estacionalidad de la enfermedad en los humanos y la proporción de infección natural de las *Lutzomyias* con *Bartonella bacilliformis*.

Incriminación vectorial

Por muchos años no se pudo cultivar *Lutzomyias* para determinar si estaban infectadas. Latorre pudo aislar *Bartonella bacilliformis* en 1988 de titiras crioconservadas, sin embargo no se pudo hacer una diferenciación bacteriológicas por falta de herramientas (Latorre et al 1989). Gracias a las nuevas técnicas moleculares ahora ya es posible hacer las confirmaciones con alta confiabilidad.

Existen cinco criterios para incriminar a un vector como responsable de una infección (Killick-Kendrick & Ward 1981). Dos de los criterios que aún no se cumplen son:

Se debe demostrar que las moscas infectadas deben mantener la infección a través de todo el ciclo de vida del patógeno.

La transmisión experimental de *Bartonella bacilliformis* por la picadura u otro medio sería un medio probatorio definitivo que la Lutzomyia es el vector de dicho patógeno.

Este estudio nos dará una herramienta diagnostica con la sensibilidad adecuada para poder establecer los criterios faltantes para incriminar a las Lutzomyias como el vector de la bartonellosis.

Prevención y control

La mayoría de técnicas de prevención y control son en base a insecticidas y estas generalmente se aplican aleatoriamente o cuando hay aumento de población de vectores.

Otra alternativa es dar antibióticos a los pacientes y los posibles infectados para controlar el ciclo ya que se supone que el humano es el reservorio de la enfermedad.

Actualmente se utiliza permetrina para controlar las áreas endémicas y epidémicas (MINSA). También se recomienda mejorar las construcciones de las viviendas de las zonas involucradas. Como es el tarrajeo de paredes para evitar que los vectores se críen en las grietas de adobe.

Principios del PCR en tiempo real

Fundamento de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que replica el ADN in vitro. Se busca una secuencia genética con la ayuda de un patrón en una muestra con ADN, a la cual se le induce a diferentes temperaturas de calor a frio para denaturar y alinear las moléculas de manera repetitiva. Se utilizan equipos llamados termocicladores para poder realizar estos pasos (McPherson

& Moller 2000).

Análisis del producto de la reacción

En el caso de PCR convencional se debe evidenciar si hay producto de la reacción en cada tubo o pozo. Se puede usar varias técnicas, como es el gel electroforesis con bromuro de etidio o southern blot (Innis & Gelfand 1990; McPherson & Moller 2000). Los productos amplificados deben tener un número de pares de bases dentro de los esperado (bp) y esto es medido comparando la migración con una muestra patrón o "ladder".

PCR en tiempo real

La diferencia que hay entre el PCR convencional con el PCR en tiempo real es la forma de detección de los productos. En vez de tener los pasos adicionales que se tienen que realizar con el PCR convencional, se usa un equipo que detecta las amplificaciones mientras se realizan los ciclos. Estos equipos tienen la capacidad de llegar a las temperaturas programadas más rápidamente que los equipos convencionales, reduciendo el tiempo de amplificación. Estos novedosos equipos incorporan la tecnología de escaneo de fluorescencia y algunos tienen la capacidad de detectar varios fluorocromos, haciendo posible detectar más de un blanco en una muestra en una sola corrida. Esta técnica tiene el beneficio adicional de obtener concentraciones de la secuencia blanco en las muestras.

Diseño de cebadores

Se recomienda usar un programa de diseño de cebadores para obtener resultados óptimos con un contenido de G-C alto para tener enlaces fuertes, y que evite las posibilidades de superposición de los cebadores con la sonda taqman, que permite observar la cantidad de producto amplificado. El programa

Primer Express está disponible en la web y es de fácil uso.

Sondas taqman

La forma de detectar un producto amplificado es por medio de fluorocromos, que están adosados a un oligonucleótido. En el lado de 5' está el fluorocromo reportador y en el lado 3' estará el fluorocromo quencher o desactivador. Cuando se encuentra la secuencia blanco, la sonda se va a pegar a la muestra avanzando y al adherirse a la cadena blanco el reportador se separa liberando la señal fluorescente. En cada ciclo se va a realizar este proceso de tal manera que a mayor cantidad de secuencia blanco mayor cantidad de fluorescente liberado, logrando una señal directamente proporcional a la concentración.

El gen Citrato sintetasa: gltA

Para diseñar los cebadores se decidió utilizar el gen de citrato sintetasa por la amplia información disponible. Este gen codifica la enzima del citrato sintetasa, enzima que es importante componente del ciclo del ácido cítrico. El Citrato sintetasa se encuentra en casi todas células capaces de metabolismo oxidativo. Hay dos tipos principales de citrato sintetasa: una fórmula multimérica encontrada en los Proteobacteria y la fórmula dimérica encontrados en los Eukarya. Esta enzima tiene funciones reguladoras distintas en Proteobacteria y en Eukarya. Este gen ha sido usado ampliamente para el análisis filogenético para un grupo de bacterias de *Rickettsiae sp.* y *Bartonella sp.* El secuenciamiento del citrato sintetasa en los humanos ha revelado que este gen se localiza en cromosoma 12 (Goldenthal & Marin-García 1998).

Una comparación de las secuencias del *gltA* de las diferentes especies de *Bartonella* mostró la similitud de 83.8 a 93.5%, y las comparaciones de secuencias entre las mismas especies revela niveles de similitud eran mayores que 99.8% (Birtles & Raoult 1996). Estos datos revelan que las secuencias de *gltA* son altamente conservadas entre las cepas de *Bartonella bacilliformis* haciéndola un buen blanco para el análisis (Hambuch et. al 2004).

Materiales y Métodos

Este es un estudio descriptivo y retrospectivo estacional. Como ya se había realizado un estudio anterior analizando muestras de una zona endémica, se trabajó en base de los procedimientos utilizados previamente, esto ayudo considerablemente ya que se contaba con el diseño de cebadores para la detección de *Bartonella* a partir de triturado de Lutzomyias. Se tenía que estandarizar el procedimiento en un nuevo equipo ya que no se contaba para este estudio el mismo equipo de PCR en tiempo real que en el estudio anterior.

Lugar del estudio

Cusco poblados de Parapujio, Mocoriase y Cusipata del distrito de Cusipata de la provincia de Quispicanchi, Región Cusco. Latitud Sur: 13° 53' 8" S, Longitud Oeste: 71° 31' 4.9" W, Altitud: **3380** msnm.

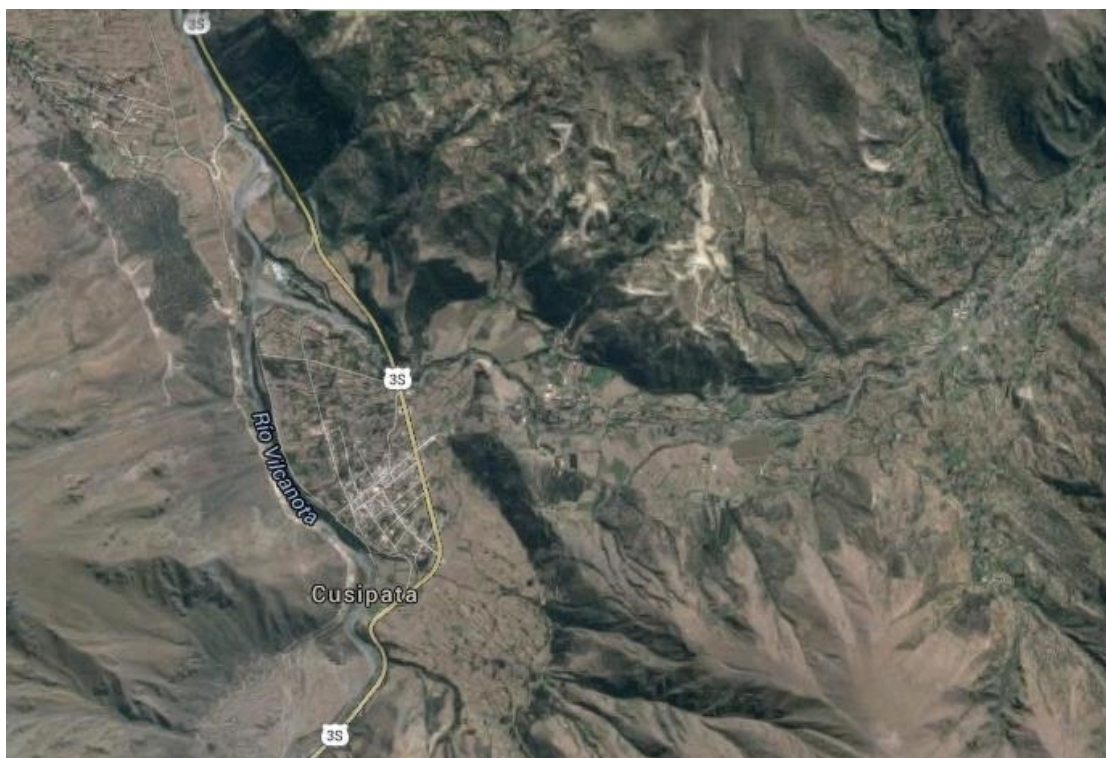


Figura 7. Poblados estudiados

Google Earth

Obtención de muestras de Lutzomyias

Se realizó un estudio de estacionalidad luego del brote epidémico en Cusco en 1999, las muestras procesadas (627) son de la recolecta realizada entre los años 2001 al 2003.

Las titiras fueron recolectadas con trampas de luz de CDC puestas dentro y fuera de dos casas diferentes por pueblo. Se atrajeron los insectos con una luz operada a batería en las trampas, quedando atrapados en la bolsa de colección por succión. Las trampas se encendieron a las 1800 horas y se apagaron a las 0600 horas; momento en el cual las bolsas fueron cerradas para impedir que las *Lutzomyias* escaparan y recolectadas para su posterior identificación.

Se muestreo 5 casas en Cusipata, 9 en Moccoraize y 5 en Parapujio. Se informó a las comunidades los alcances del estudio participando todos los miembros del Equipo *Bartonella*.



Figura 8. Pobladores de Cusipata. (Cortesía Dr. Richard Andre)

Se identificaron entonces las especies usando las claves de Young & Duncan, y las hembras fueron separadas y clasificadas de acuerdo a si mostraban evidencia de sangre en el abdomen. La mayoría de las *Lutzomyias* capturadas fueron de la especie peruensis. Las *Lutzomyias* sin evidencia de sangre se colocaron en tubos conteniendo 80% de etanol, fueron numeradas luego

etiquetadas con un código, y se guardaron en el alcohol hasta el momento de la extracción para el ADN. Las tiras con sangre se analizaron para identificar el tipo de sangre por el método de ELISA. Los resultados de este análisis de ELISA evidencio que las titiras prefieren a los humanos como su principal fuente de sangre. Confirmando lo encontrado en otros estudios, estos resultados nos muestran que las *Lutzomya peruensis* son antropofílicas de preferencia. Se usó para nuestro estudio hembras sin sangre ya que son estas titiras las que intentaran alimentarse y si estuvieran infectadas contagiarían la enfermedad lo que nos dará un índice de probabilidad de infección.

Se obtuvo Lutzomyias de colonias sin alimentar de Walter Reed Army Institute Research (WRAIR) y NAMRU-6 como muestras negativas de titiras.



Figura 9. Muestras evaporando el alcohol

Aislamiento del ADN de Lutzomyia usando el Qiagen Dneasy Tissue Kit

A las *Lutzomyias* seleccionadas se les saco el alcohol permitiendo airear hasta secar durante 30 minutos. Entonces se colocaron de una a cinco

Lutzomyias en un tubo de microcentrifuga, (según el número de titiras encontradas en la recolección, en múltiplos de 5 y la diferencia en un tubo para ser tratados igual que los múltiplos) y se agregó 180µl de buffer ATL y 20µl de Proteinase K del kit. (Qiagen, Valencia, Calif.). Con la ayuda de un molidor manual estéril, uno por pool, se desmenuzaron las titiras hasta que no quedo ninguna parte reconocible. Se usaron moledores individuales para cada pool para evitar la contaminación entre las muestras. Se usó un homogenizador a baterías para facilitar el trabajo de triturado.



Figura 10. Machacado de las muestras

Se incubaron las muestras a 42°C toda la noche en un baño de María. Se agregaron 200µl de buffer AL, asegurándose antes que bajen las gotas de condensación de la tapa y se vortexeo inmediatamente. Los tubos luego fueron incubados en un bloque de calor a 70°C por 10 min, y se agregó 200µl de EtOH al 100% y se vortexearon. Se transfirieron los volúmenes de cada tubo a una columna Qiagen dentro de un tubo de la colección. Se tuvo mucho cuidado al transferir la muestra para evitar mojar el borde de la columna de esta manera se redujo la contaminación. El tubo se centrifugó a las 10,000rpm durante 1 minuto.

El eluido fue reunido en un tubo de colección limpio y el filtrado se desechó. La columna se lavó con 500µl de AW1 que es un buffer para lavados y se centrifugó por 1 min a 10,000rpm. El segundo lavado uso 500µl de buffer AW2, y se centrifugó por 3 min a 13,000rpm. La columna se centrifugó una última vez en un tubo limpio para eliminar cualquier buffer restante. Esto se hace para evitar que se quede restos de alcohol que pueda interferir con la prueba de PCR. El volumen del buffer de elución dependió del número de titiras que hubo inicialmente en cada pool. Los pooles fueron eluidos de la siguiente manera: para una o dos titiras se dio dos lavados de 25µl de buffer de elusión, para tres a cuatro titiras se dio dos lavados de 40µl de buffer de elusión. Los pools con cinco titiras fueron eluidos con 2 enjuagues de 50µl de buffer de elución para un volumen final de 100µl.

Las titiras que se usaron como muestras positivas fueron preparadas usando glóbulos rojos infectados. Los eritrocitos fueron infectadas usando el método de cultivo de Trager-Jensen (Trager & Jensen 1976) este es un método de cultivo usado para *Plasmodium falciparum*. Este método se modificó para *Bartonella* de la siguiente manera: se preparó sangre humana al 10x, usando 10 ml de sangre de ser posible O+, humana en bolsas de CPD-1, porque este anticoagulante conservará las células rojas durante 35 días (Banco de Sangre Interestatal, Inc., Memphis, TN). La sangre fue centrifugada para eliminar el suero y la capa de glóbulos blancos completamente. Las células se lavaron con RPMI tres veces. Los glóbulos rojos fueron entonces resuspendidos a 8-12% con RPMI + 10% FBS (suero fetal bovino). Estos eritrocitos son los que se utilizan para luego infectarlos con *B. bacilliformis*.

La sangre infectada que se usó para alimentar o motear las tiras, se preparó usando suero humano tipo "O" que reemplazó al FBS. Cinco ml de esta suspensión fueron agregadas a frascos de cuello-inclinado de 25cc (Falcón, Franklin Lakes, NJ). La suspensión se inoculó después con 1 ml de un cultivo de *Bartonella bacilliformis*. Este procedimiento también puede hacerse usando sangre de un paciente infectado. Los frascos se incubaron en un frasco de la vela a las 28°C durante tres días. Un frasco de control sin inoculación de *Bartonella bacilliformis* se mantuvo cada vez. Para evaluar el crecimiento en las células se realizó extendidos los cuales se colorearon con Giemsa para visualizar los organismos, tomando una gota del sedimento y preparando una lámina con frotis y gota gruesa cada dos días a partir del quinto día de cultivo. Se colorearon las láminas con Giemsa (Sigma) para ver la presencia de las formas bacilares. A veces los cultivos son predominantemente coccoides, y sangre fresca es agregada para inducir la transformación del bacilo, se usó los cultivos de preferencia en su forma bacilar. Cultivos antiguos tienden a volverse coccoides.

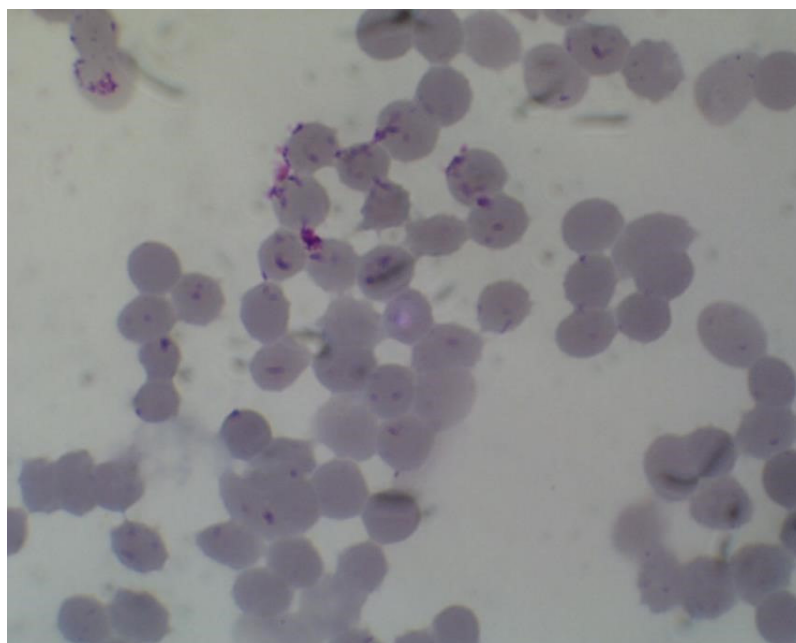


Figura 11. Coloración Giemsa de cultivo T-J

Cuando el cultivo en sangre muestra formas bacilares, el cultivo estaba listo para motear a la titras o para alimentarlas. Las titras se motearon con sangre infectada como sigue: 0.2ul para 1 titra, 0.4ul para 2 titras, 0.6ul para 3 titras, 0.8ul para 4 titras y 1ul para 5 titras. Luego se procedió a tratar las muestras como las titras capturadas usando el protocolo previamente descrito usando Qiagen DNeasy Tissue Kit para extracción de ADN de titras luego de la moteada.

Detección de ADN con electroforesis

Este procedimiento fue utilizado para verificar los controles y observar si la migración de los productos coincidía con el peso esperado de 379bp cuando se corre PCR convencional. Para obtener resultados visuales de las muestras positivas, para este estudio se trabajó con geles de agarosa básicamente para evaluar los diferentes equipos disponibles para determinar la mejor alternativa.

Se usaron geles con buffer TBE de calidad para biología molecular (GibcoBRL) y Agarosa-1000 (GibcoBRL) a una concentración de 2.0% calentado durante 1

minuto. El gel se enfrió a 40-50°C antes de agregar 5µl de solución de bromuro de etidio, 10 mg/ml (GibcoBRL), entonces se colocara en una bandeja. Los pozos se cargan con 8µl de muestra (ADN) mas 2µl de glicerol con colorantes al 5X (AMRESCO) para una dilución final de 1:5. Después que todas las muestras estén cargadas, los geles se corrieron a 80V durante 1-2 horas. Se fotografiaron los geles usando un Gel Doc100 (BIO RAD) este equipo incluye una cámara digital y se guardaron las fotos en archivos de GIF para el análisis posterior.

PCR en tiempo real usando el termociclador ABI 5700

El primer equipo disponible en NAMRU-6 fue el ABI 5700, era una buena opción ya que tiene la capacidad de procesar 96 muestras en una corrida.

Una consideración importante cuando se va a correr una prueba de PCR es la contaminación que puede causarse con productos de PCR amplificados de otros tubos del mismo ensayo o causado por los productos de PCR anteriores. La mezcla para la reacción de PCR se prepara dentro de una cabina usando materiales descartables. Se probaron los juegos de primers inicialmente con Sybr Green para determinar la eficacia de los mismos en el ABI5700 y el TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG de Applied Biosystems, Foster City, CA. Estos primers también fueron usados inicialmente el Lightcycler 1.2 de NAMRU-6 (Naval Medical Research Unit 6) para realizar las corridas en tiempo real ya que en el estudio anterior se usó el Lightcycler 1.0 con muy buenos resultados- La desventaja es que solo puede correr 32 muestras por corrida. Cada mezcla de amplificación usa concentraciones de 200 µM de cada dinucleótido (dNTPs) (Idaho Technology, Salt Lake, Utah), 2 U de Taq polimerasa (BIORAD, Hércules, CA), 250nM de cada primer, agua de PCR, 1x de buffer y 1x

de diluyente de enzima (Idaho Technology, Salt Lake, Utah). Sybr Green dye (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) se usaron en las pruebas iniciales a una concentración final de 1:30,000, y luego fue reemplazado por la sonda. El volumen total de la reacción fue de 50 µl. Los resultados obtenidos con los controles no fueron los esperados por lo que se buscó alternativas con otros equipos. Se corrió 50 muestras “Negativas” humanas, 2 de ellas dieron CT’s bajos. Se repitió usando PCR convencional para obtener un amplicon lo suficientemente grande para secuenciar si fuera necesario. Todas fueron negativas luego de la repetición. Se corrieron también 35 pooles de *Lutzomyia* “Negativas”, de ellas 2 fueron positivas con Taqman, fueron negativas luego de la repetición.

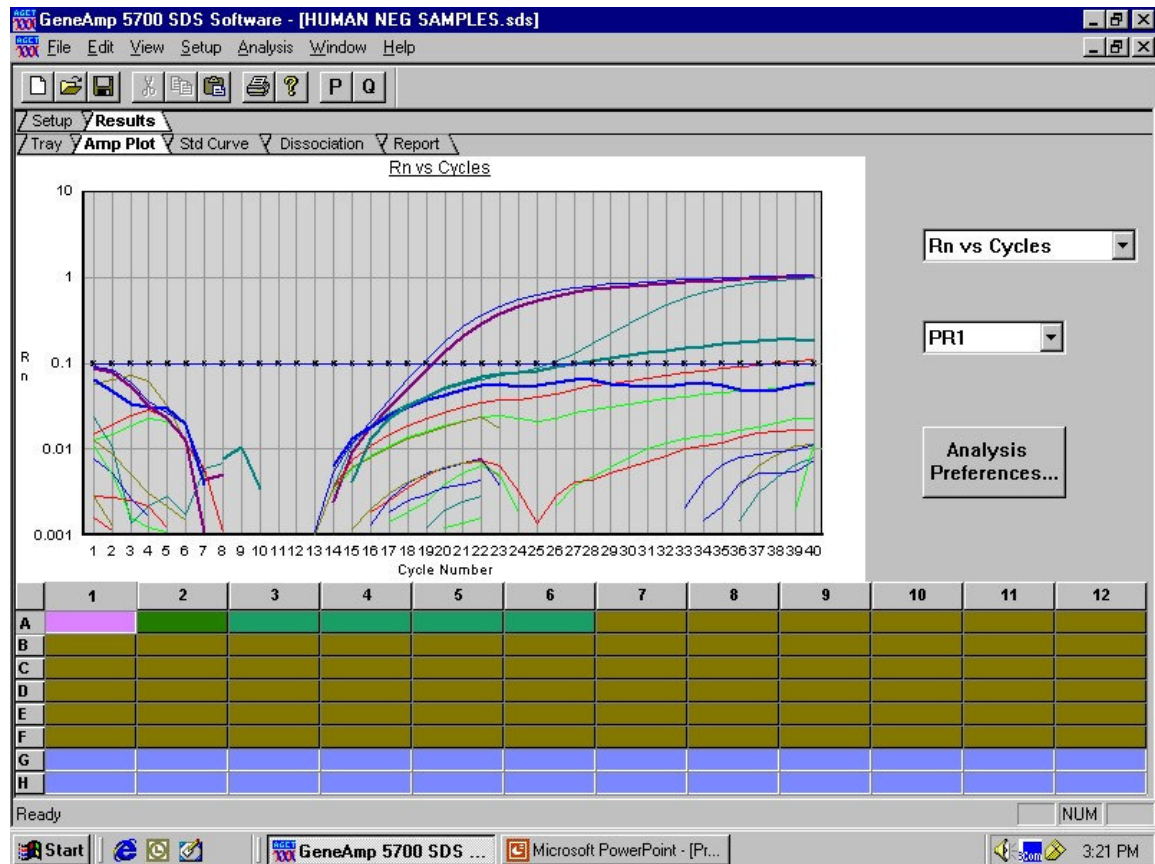


Figura 12. Resultado con ruido del PCR en tiempo real usando el termociclador ABI 5700

Al correr el protocolo para determinar el límite de detección se obtuvo un valor de 100pg de LOD. Esto significa que en este equipo solo se pueden detectar concentraciones de DNA de 100pg o más. Esta concentración es muy alta y se requería un equipo con la capacidad de detectar concentraciones más pequeñas. Por lo que se decidió esperar hasta que llegara un nuevo equipo al laboratorio el Taqman 7300 de Applied Biosystem.

File: NEG CONTROLS 05-23-05.s
User: Administrator
Plate Type: 5700 Quantitation
PCR Volume: 25 mL
Threshold: 0.009

Stage	Temperature	Time	Repeat	Ramp Time	Auto Increment
1	50.0 C	0:10	1	Auto	
2	95.0 C	1:00	1	Auto	
3	95.0 C	0:10	40	Auto	
	60.0 C	0:30		Auto	

Primer/Probe	Name
PR1	Primer 1

Well Type	Name	Primer/Probe	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty
A1	NTC	PR1	40.00	0.00			
A2	UNKN	POOL 1 PAPATO	40.00	0.00			
A3	UNKN	POOL5	40.00	0.00			
A4	UNKN	POOL4 L	40.00	0.00			
A5	UNKN	HUMAN3	40.00	0.00			
B1	NTC	PR1	40.00	0.00			
B2	UNKN	POOL 1 PAPATO	40.00	0.00			
B3	UNKN	POOL5	40.00	0.00			
B4	UNKN	POOL4 L	40.00	0.00			
B5	UNKN	HUMAN3	40.00	0.00			
C1	STND	100PG	40.00	0.00			
C2	UNKN	POOL2	12.11	19.72			
C3	UNKN	POOL1 LONGIP	40.00	0.00			
C4	UNKN	POOL5 L	40.00	0.00			
C5	UNKN	HUMAN4	40.00	0.00			
D1	STND	100PG	40.00	0.00			
D2	UNKN	POOL2	40.00	19.72			
D3	UNKN	POOL1 LONGIP	40.00	0.00			
D4	UNKN	POOL5 L	40.00	0.00			
D5	UNKN	HUMAN4	40.00	0.00			
E1	STND	10PG	40.00	0.00			
E2	UNKN	POOL3	40.00	0.00			
E3	UNKN	POOL2 L	40.00	0.00			
E4	UNKN	HUMAN1	40.00	0.00			
F1	STND	10PG	40.00	0.00			
F2	UNKN	POOL3	40.00	0.00			
F3	UNKN	POOL2 L	40.00	0.00			
F4	UNKN	HUMAN1	40.00	0.00			
G1	STND	100FG	40.00	0.00			
G2	UNKN	POOL4	40.00	0.00			
G3	UNKN	POOL3 L	40.00	0.00			
G4	UNKN	HUMAN2	40.00	0.00			
H1	STND	100FG	40.00	0.00			
H2	UNKN	POOL4	40.00	0.00			
H3	UNKN	POOL3 L	40.00	0.00			

NEG CONTROLS 05-23-05.sds - Page 1

Figura 13. Resultados de controles negativos

A la llegada del Taqman 7300 se repitió las corridas pero los resultados fueron similares y con mayor ruido de fondo, por lo que se optó por buscar otro equipo para este estudio. Sin embargo los estándares dieron muy buenos resultados, de trabajar con este equipo se hubiera tenido que subir el valor del umbral para retirar

el ruido y así evitar los falsos positivos. Se tendría que evaluar los reactivos adecuados para realizar corridas de esta prueba en este equipo, ya que ofrece la ventaja de correr 96 pruebas a la vez.

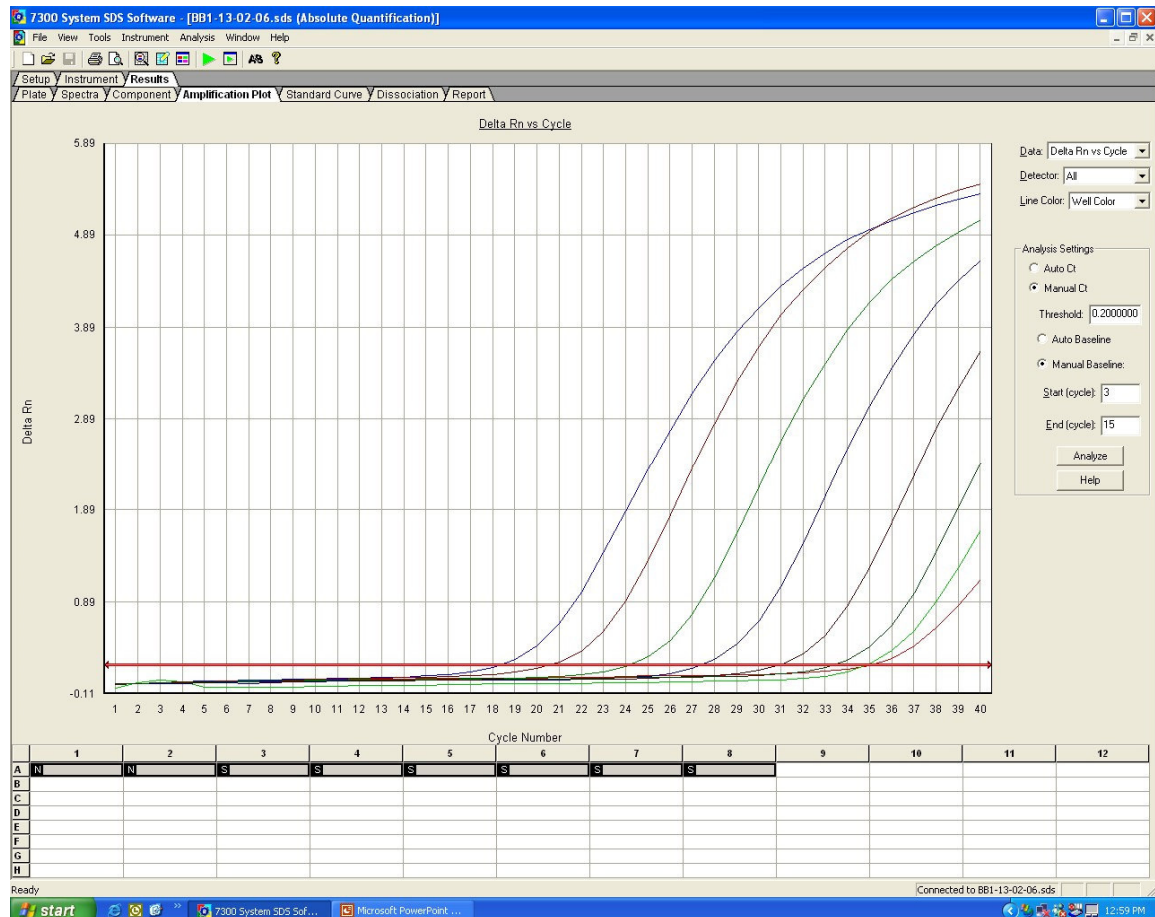


Figura 14. Corrida de estándares con el Taqman 7300

PCR en tiempo real usando el termociclador Lightcycler 1.2

Esperando la llegada del Taqman 7300 se decidió intentar realizar el protocolo de trabajo en los equipos disponibles. Tomando en cuenta que el primer estudio que se realizó para detección de *Bartonella* en Lutzomyias fue realizado en el Lightcycler 1.0 se decidió estandarizar la prueba en la nueva versión. La desventaja de usar este equipo es la cantidad de muestras que se pueden correr a la vez. Se usó el equipo que se encontraba en NAMRU-6. Sin embargo los

resultados no fueron como lo esperado, ya que los CT's fueron muy bajos aun para controles de alta concentración. Se había importado los reactivos Taqman mix, ya que se había conversado con NAMRU-6 la disponibilidad de equipos y se tenía previsto la llegada del Taqman 7300.

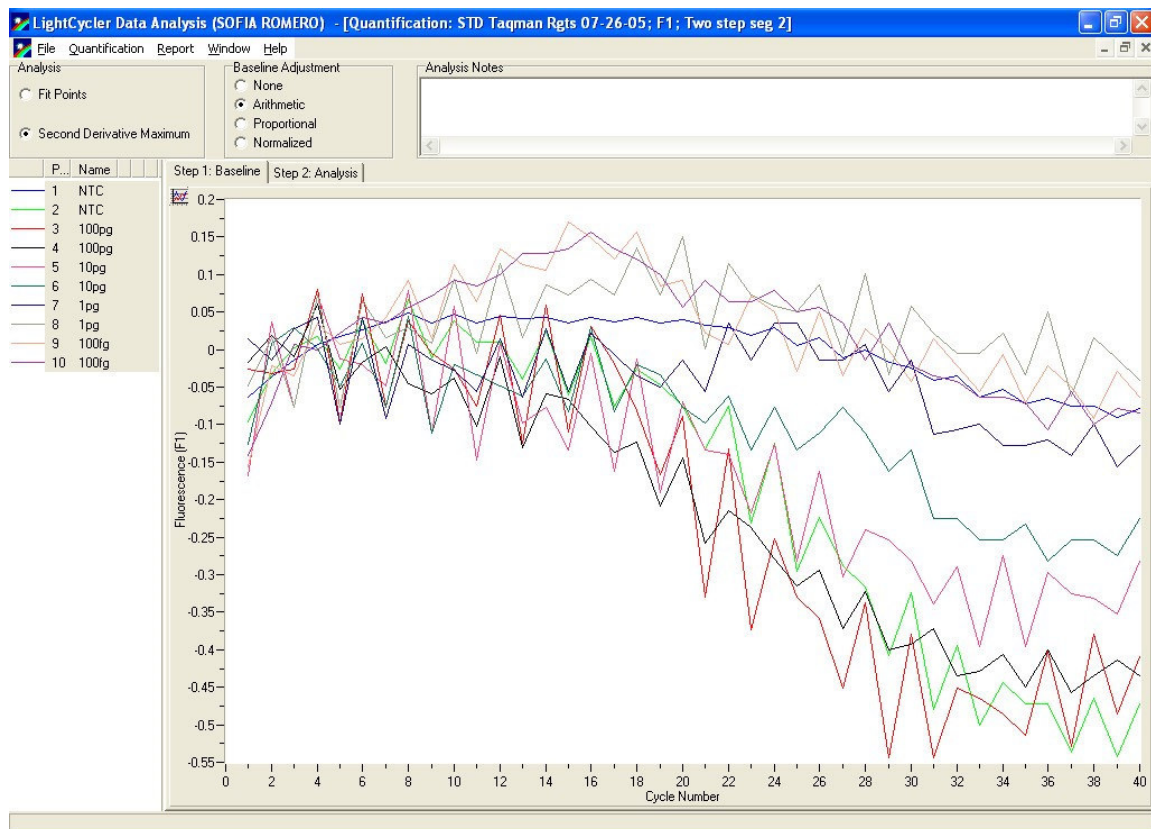


Figura 15. PCR en tiempo real usando reactivos Taqman en el Lightcycler 1.2

Se trató de usar dichos reactivos en el Lightcycler sin embargo los resultados fueron muy malos. Es importante usar reactivos específicos para este equipo para tener los resultados esperados que son excelentes, tal como lo reportado en el estudio previo y como se demuestra en la figura 16.

El protocolo funcionaba con los reactivos usados en el estudio anterior, que son los reactivos de para la mezcla de PCR por separado, es decir dNTP's, Taq polimerasa, agua grado molecular, buffer y enzimas. Cada mezcla de

amplificación usa concentraciones de 200 μM de cada dinucleótido (dNTPs) (Idaho Technology, Salt Lake, Utah), 2 U de Taq polimerasa (BIORAD, Hércules, CA), 250nM de cada primer, agua de PCR, 1x de buffer y 1x de diluyente de enzima (Idaho Technology, Salt Lake, Utah).

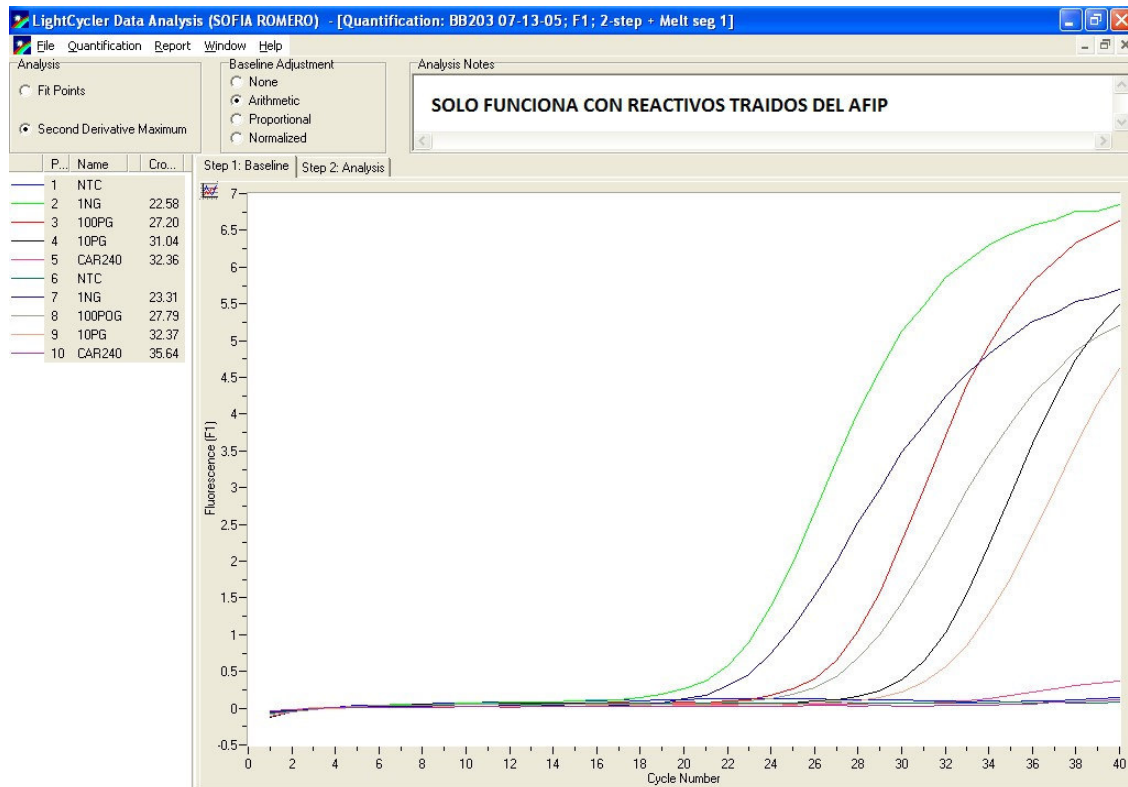


Figura 16. Resultados con reactivos usados previamente en el Lightcycler 1.2

PCR en tiempo real usando el termociclador Chromo4

Debido a los resultados obtenidos en los equipos anteriores se buscó un equipo más, para tener una alternativa adicional. Se llamó a todos los distribuidores de equipos moleculares para que indicaran que laboratorio había adquirido equipos de alta performance. Fue así que se supo que la Facultad de Medicina Veterinaria había recibido un Chromo4 de Biorad. Luego de varias coordinaciones se consiguió el permiso para trabajar con el equipo Chromo4,

obteniendo los mejores resultados entre todas las pruebas realizadas. Se logró resultados limpios y se pudo trabajar 90 muestras de pooles a la vez.

Optimización de la concentración de los cebadores (primer)

Se prepara primero, una mezcla patrón sin agregar los cebadores. Se prepara un panel con 25 tubos con diferentes concentraciones de cada primer. Empezando con diluciones de cebadores de $1\mu\text{M}$, $2.5\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $7.5\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ de cada primer combinándolos de tal manera que existan 25 combinaciones. Cada combinación se corre por duplicado. La fluorescencia más alta y el valor de CT (valor del umbral) más bajo se usa para determinar la selección de la dilución óptima. El valor de CT es el número de ciclos necesitado para que la señal de fluorescencia sea detectada. Este número tiene una relación inversamente proporcional a la cantidad de ADN de la muestra. La concentración óptima final de trabajo del primer encontrada fue de $2.5\mu\text{M}$, la concentración final en el tubo de reacción fue de $0.1\mu\text{M}$.

Optimización de la concentración de la sonda

Una vez que se eligió la concentración del cebador, la sonda se probó para encontrar su concentración óptima. Las sondas están marcadas con Taqman® TAMRA™ con 6FAM™ en el extremo de 5', y con TAMRA™ en el extremo 3'. Las sondas se compraron de Applied Biosystems, Foster City, CA.

Se prepararon cinco concentraciones de la acción de sonda: $0.5\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ y $4\mu\text{M}$ para una concentración final de 50nM , 100nM , 200nM , 300nM y 400nM , respectivamente. La concentración óptima de sonda encontrada fue de $2\mu\text{M}$.

El límite de cuantificación detectable

El límite óptimo detectable (LOD) para cada ensayo se evalúa con muestras de cuantificadas de ADN purificado usando un espectrofotómetro. El ADN extraído a partir de 200µl de cada muestra es eluido hasta con 100µl de buffer de elución. Se usó 2µl del ADN para cada reacción de PCR.

El DNA deberá ser diluido en el momento con diluciones en serie al décimo con las siguientes concentraciones finales de 1ng/5µl, 100pg/5µl, 10pg/5µl, 1pg/5µl, 100fg/5µl, 10fg/5µl y 1fg/5µl. Éstos se probaran para obtener el límite óptimo detectable.

La especificidad

La especificidad para *Bartonella bacilliformis* se obtiene usando una batería de cepas controles estrechamente relacionadas y con otros organismos no tan relacionados. Todos los cebadores y sondas fueron probados para observar la especificidad con ADN de *B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii* y *B. elizabethae*. Los cebadores que se usaron fueron probados con doce cepas de *Bartonella bacilliformis* como positivos: HOSP800-29, Sandi, HOSP800-09, PAT360, CUS006, CUS005, PAT300, HOSP800-72, HOSP800-76, 10502 (CUSCO), VER0075, y CUS80804. Todas estas cepas fueron cultivadas a partir de aislamiento primario con método de cultivo F-1 modificado. Estas cepas luego fueron repicadas y como parte del estudio de cohorte fueron secuenciadas en USUHS para confirmar la cepa como *B. bacilliformis*.

Análisis estadístico

La sensibilidad de este procedimiento para la detección de *Bartonella bacilliformis* será determinada dividiendo el número de resultados positivos verdaderos por el número de muestras controles de *Bartonella bacilliformis*. La

especificidad del ensayo será calculada dividiendo el número de resultados negativos verdaderos por el número de controles negativos.

Observe que la sensibilidad y la especificidad solamente indican la proporción o porcentaje de los que han sido correctamente clasificados como negativos o como positivos.

Se calculó el valor predictivo de las pruebas negativas y positivas usando las siguientes fórmulas:

RESULTADO DE LA PRUEBA	SITUACION		TOTAL
	LUTZOMYIAS INFECTADA	LUTZOMYIA o PACIENTE NO INFECTADO	
POSITIVO	a	b	a + b
NEGATIVO	c	d	c + d
TOTAL	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b+d} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de las pruebas positivas} = \frac{a}{a+b} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de las pruebas negativas} = \frac{d}{c+d} \times 100$$

Valor predictivo de una prueba positiva es igual al Número de individuos enfermos y positivos entre el total de individuos positivos.

Valor predictivo de una prueba negativa es igual al Número de individuos sanos y negativos entre el total de individuos negativos. (Riegelman R. K. & Hirsch R. P. 1995)

Resultados

Este estudio fue diseñado inicialmente para poder detectar el porcentaje de Lutzomyias infectadas *in vitro* para poder luego evaluar Lutzomyias infectadas *in vivo* y así relacionarlas como el vector de la enfermedad de Carrión. Inicialmente se realizó pruebas con PCR convencional usando primers *gltA* de Norman et. al. 1995 pero esta técnica no es lo suficientemente sensible. Es así que se buscó una herramienta más sensible capaz de detectar un vector infectado. Se decidió trabajar con PCR tiempo real ya que es una metodología rápida y muy sensible. En el estudio previo a este trabajo se procesó muestras de una zona endémica se usó esta técnica con el equipo Lightcycler 1.0 de Roche. Si bien los resultados obtenidos fueron muy buenos, con los reactivos adecuados este equipo solo permite procesar 30 muestras a la vez y se buscó para este estudio un equipo con mayor capacidad. Se trató de replicar con el equipo Lightcycler 1.2 que estaba disponible a pesar que iba a tomar más tiempo en procesar. Adicionalmente a este inconveniente no se contaba con suficiente reactivos para este método ya que se había importado reactivo para sistema Taqman o similar.

Se intentó procesar con el Taqman 5700, pero dio mucho ruido de fondo. Luego se evaluó el Taqman 7300 con mejores resultados pero aún menor a lo esperado. A pesar de ser un equipo de PCR en tiempo real, no se puede monitorear la evolución de los resultados durante el proceso, por lo que se buscó otra alternativa. Esto se revisó en los métodos a seguir. Se consiguió el permiso para trabajar el equipo Chromo4 de la Facultad de Medicina Veterinaria, logrando

resultados limpios y se pudo trabajar 90 muestras de pooles a la vez. Se validó el protocolo de la siguiente manera:

Para obtener tiras positivas se moteó con sangre infectada con concentraciones conocidas tratando de imitar lo que sería posible en la naturaleza. Al igual que en el estudio anterior, se moteó cada tira con 2µl por mosca con concentraciones finales desde 1ng hasta 10fg para imitar lo que se supone debe encontrarse en la naturaleza. Teniendo los datos anteriores se pudo determinar el límite de detección probando con un rango menor ya que solo se usaron 2 concentraciones 100fg y 10fg.

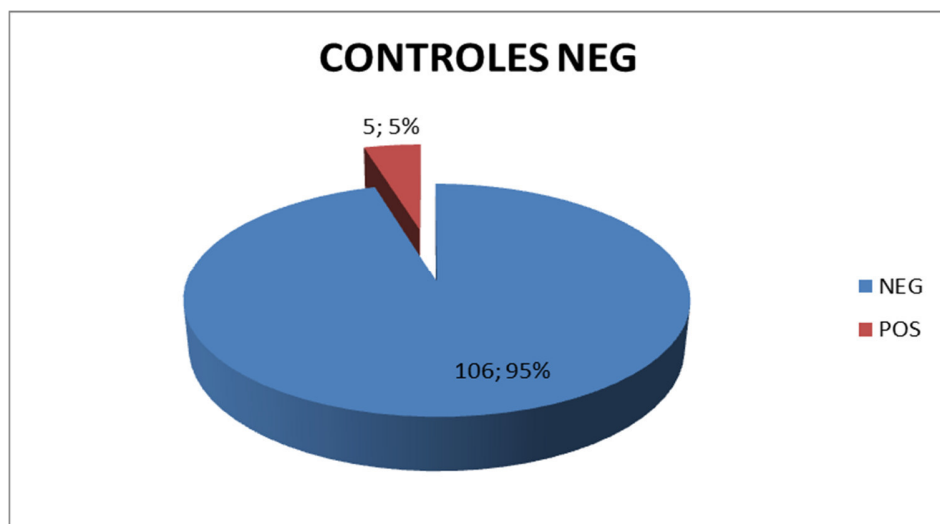
Para asegurar que este estudio detecte toda tira infectada se realizó un análisis para encontrar el límite de detección (LOD), se realizó un estudio de 30/30 determinando que el LOD es de 100fg, valor similar del estudio anterior usando Lightcycler. Sin embargo es importante destacar que en un estudio usando 10fg dio un valor mayor que en el estudio anterior ya que dio un resultado de 26/30. Estos estudios fueron realizados usando un control negativo y otro positivo. Debido que el 100% de las muestras fueron positivas en el estudio usando 100fg, es la razón por lo que se estableció que el LOD es de 100fg cuando se usa la sonda BB2-203. Cabe recordar que esta sonda fue escogida entre 5 otras demostrando ser la de mejor resultados. Se usó 12 cepas de *Bartonella bacilliformis* para probar esta sonda y en todas ellas dio señal positiva comprobando su sensibilidad de 100%.

La especificidad de la sonda se comprobó usando diferentes especies de *Bartonella*: *Bartonella henselae*, *Bartonella vinsonii*, *Bartonella quintana* and

Bartonella elizabethae proporcionadas por el AFIP, y solo *Bartonella vinsonii* dio una débil señal positiva. Se corrieron 10 cepas 2 de ellas fueron *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* estos datos se agregaron para determinar la especificidad. Estos resultados se comprobaron usando gel electroforesis donde se considera resultado positivo al observar una banda de 75bp.

Para asegurar que los cebadores no dieran reacción cruzada con DNA humano se corrió 50 muestras humanas sanas de personal militar que fueron al Centro Medico Naval para su examen psicofísico anual. Se utilizó el mismo tubo de sangre que se procesó el análisis hematológico por lo que no implico tomar un tubo adicional de sangre.

Todos los voluntarios procesados fueron negativos, aunque se tuvo que repetir dos muestras que dieron un resultado bajo por lo que se les consideró como positivo para el recuento para determinar la especificidad.



	NEG	POS
BLANCOS	5	1
PACIENTES NEG	48	2
LUTZOMYIAS	45	0
CEPAS <i>BARTONELLA</i> SP	8	2

CONTROLES NEG	106	5
---------------	-----	---

Tabla 2. Resultados de los controles.

La sensibilidad de la prueba por lo tanto fue 100% y especificidad de 95.50% basada en los resultados de las muestras controles.

Este resultado fue mucho mejor que utilizando voluntarios caucásicos del estudio anterior. Se observó que existe una similitud de nuestro blanco con una porción del cromosoma 3 del gen humano que determinan características caucásicas. Estos datos fueron comprobados en el estudio anterior y fueron confirmados al secuenciar el producto amplificado.

Se extrajo el DNA de 10 pooles de lutzomyas sin alimentar de una colonia para descartar reacción cruzada con los genes de Lutzomyias. Cabe recordar que ya se había corrido 35 pooles con los equipos Taqman.

Para el estudio de sensibilidad se usó ADN de cultivos como muestras positivas. Este DNA se obtuvo de dos maneras, según el protocolo de extracción que se utiliza en el CDC usando el QIAspin kit y la otra fue desnaturalizado usando calor seco con la ayuda de bloques de calor. Al comparar la concentración de DNA en el espectrofotómetro de UV, las lecturas dieron valores similares por lo que se decidió utilizar el calor seco ya que es un método rápido y económico ya que no requiere de reactivos adicionales.

Se determinó los valores predictivos de la prueba con las muestras procesadas con valor conocido ya que no se cuenta con una prueba de oro para detección en Lutzomyias.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
RESULTADOS POSITIVOS	35	5
RESULTADOS NEGATIVOS	0	101

Tabla 3. Resultados para los Valores predictivos.

Valor predictivo de una prueba positiva es igual al número de individuos enfermos y positivos entre el total de resultados positivos con 87.50%.

Valor predictivo de una prueba negativa es igual al Número de individuos sanos y negativos entre el total de resultados negativos con 100%.

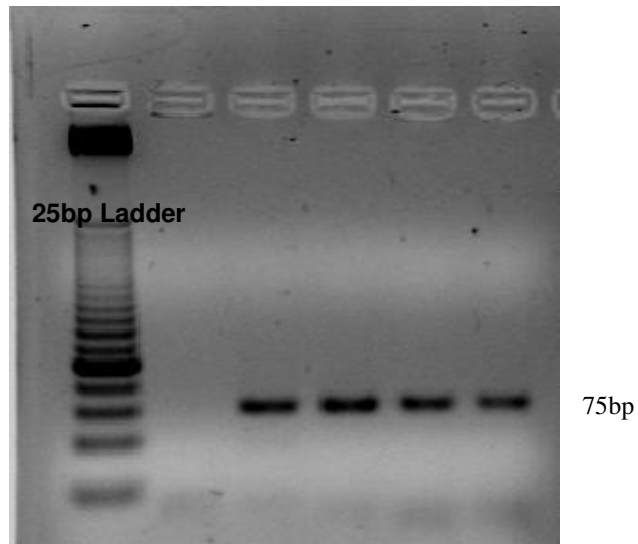


Figura 17. Corrida electroforética de productos de controles en PCR tiempo real

Tomando en cuenta este resultado se procedió a correr las muestras de campo. Estas muestras de campo archivadas se les extrajeron el DNA y luego fueron procesadas con el protocolo validado descrito previamente. Cabe recalcar que todo el trabajo se realizó tomando en cuenta las precauciones normales de esterilidad, usando material nuevo descartable en cubículos previamente esterilizados con UV. Las micropipetas fueron calibradas y validadas previo procesamiento para asegurar resultados óptimos considerando las concentraciones tan pequeñas a evaluar.

Preparación de los reactivos y muestras para el Chromo4

Se ajustó finalmente las cantidades de los reactivos y muestras de la siguiente manera por cada muestra, estas cantidades se multiplican según el número de muestras a correr:

Agua grado PCR: 3ul

Taqman master mix: 12.5ul

Cebador de ida: 2.5ul

Cebador de reversa: 2.5ul

Sonda: 2.5ul

Volumen de la mezcla 23ul y se le agrega 2ul de DNA extraído.

Para un volumen final de 25ul

Protocolo de trabajo en el Chromo4

Inicialmente se utilizó el protocolo validado para el equipo Lightcycler pero se tuvo que modificar hasta que se encontró el protocolo óptimo, donde los estándares dieron resultados con mejores CTs para la misma concentración de DNA. El primer protocolo que se intentó, uso los siguientes tiempos y temperaturas:

Paso 1: Incubar a 95 grados centígrados por un segundo

Paso 2: Incubar a 60 grados centígrados por veinte segundos

Paso 3: Lectura de placa

Paso 4: Ir del Paso 1 al Paso 4, cuarenta veces

Paso 5: Lectura de placa

Fin

Dicho ciclaje se observa en la figura siguiente, pero se buscó mejorar la performance y los tiempos, lográndolo agregando una de naturalización inicial adicional en cada ciclo. Este paso ayuda a mejorar la especificidad de la prueba.

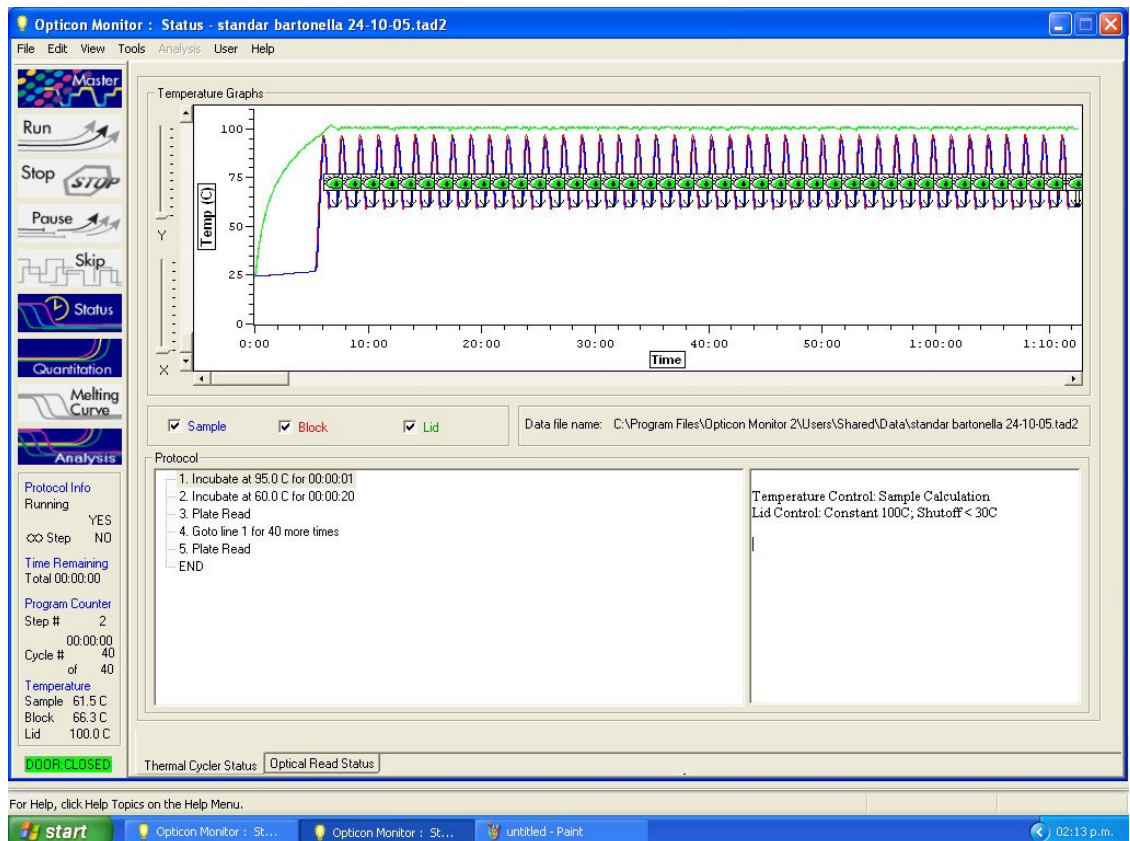


Figura 18. Protocolo de ciclaje inicial

El protocolo final que se utilizó para este estudio fue:

Paso 1: Incubar a 95 grados centígrados por diez minutos

Paso 2: Incubar a 95 grados centígrados por diez segundo

Paso 3: Incubar a 60 grados centígrados por treinta segundos

Paso 4: Ir del Paso 2 al Paso 4, treinta y nueve veces

Paso 5: Lectura de placa

Fin

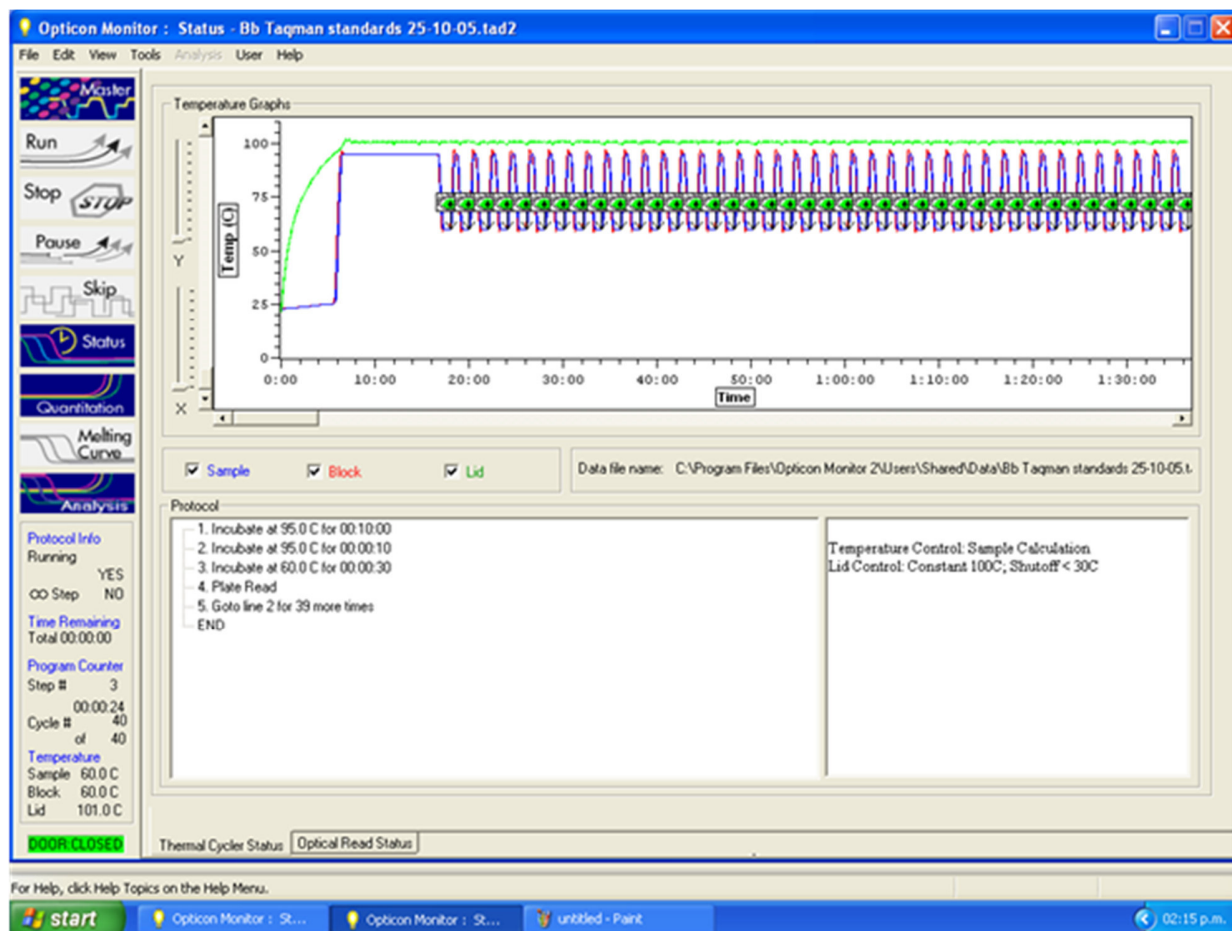


Figura 19. Protocolo de ciclaje final

Adicionalmente se probó dos tipos de tubos PCR: tubos en tira con tapas redondas y tubos con tapa plana. Los tubos de tapa plana dieron mejor lectura a menores concentraciones por lo que fueron el material de elección. La siguiente figura muestra el resultado de los controles procesados en viales con tapa redonda.

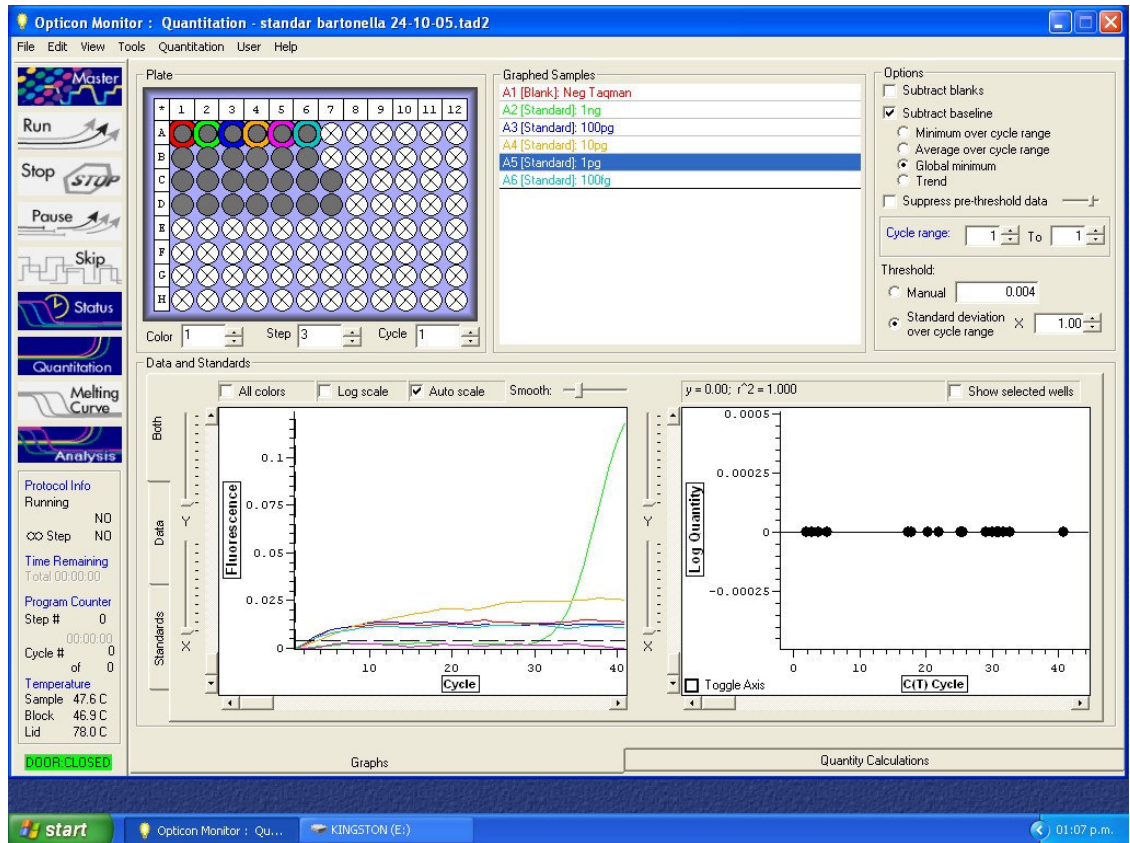


Figura 20. Punto de corte a 1pg

Aquí podemos apreciar que a una concentración de 1pg la fluorescencia alcanzada llega a un poco más de 0.1. En cambio en la siguiente figura se puede apreciar una fluorescencia de 0.15 para una concentración de 100fg, un resultado evidentemente mejor al anterior por lo que se trabajó con los tubos Taqman de tapa plana. Mejor fluorescencia para menor concentración.

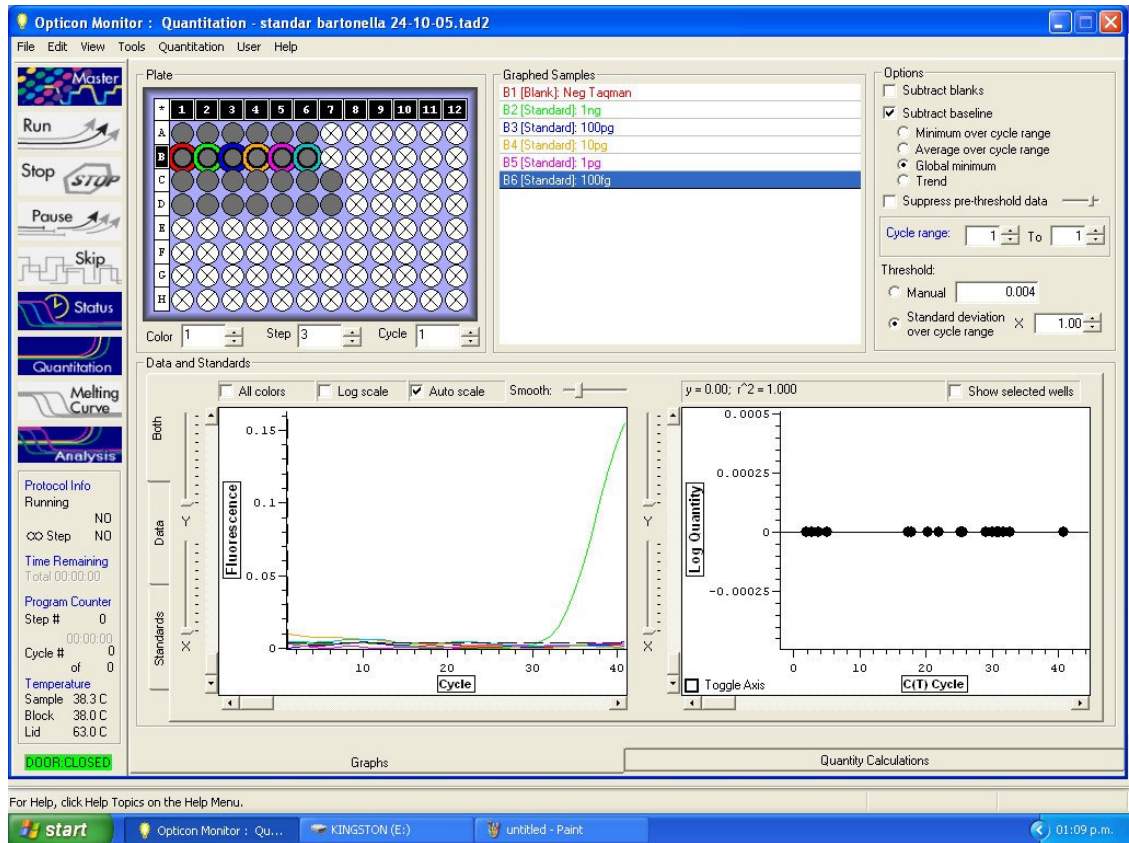


Figura 21. Punto de corte a 100fg

Muestras de campo

Unos cuantos pools de muestras de campo mostraron reacciones fuertemente positivo. Varias muestras que aparentemente fueron débil positivos fueron negativo. En este estudio los resultados mostraron claramente cuales muestras eran positivas. A diferencia del estudio anterior hubo escasas muestras dudosamente positivas, las muestras cuestionables se repitieron logrando dar un resultado final. Esto determino descartar la necesidad de secuenciar las muestras para confirmar los resultados.

Una de las ventajas de trabajar con PCR tiempo real es que permite monitorear los resultados mientras se van procesando, en su gran mayoría se

observa picos positivos antes del ciclo 36 o 37. Sin embargo tomando en cuenta nuestro punto de corte de 100fg se obtuvo 45 positivos de 627 muestras procesadas. Obteniendo un 7.18% de infectividad. Cuando se tomó en consideración un punto de corte de 10fg se obtuvo un número mayor de muestras positivas, pero si se observan las curvas, se puede notar que comienza a subir la señal bastante tardío, aunque se observó dentro de un grupo de pooles de una misma casa de los 3 pooles, 2 tenían valores muy altos y 1 pool con valor positivo tomando en cuenta un corte dentro de los 10fg.

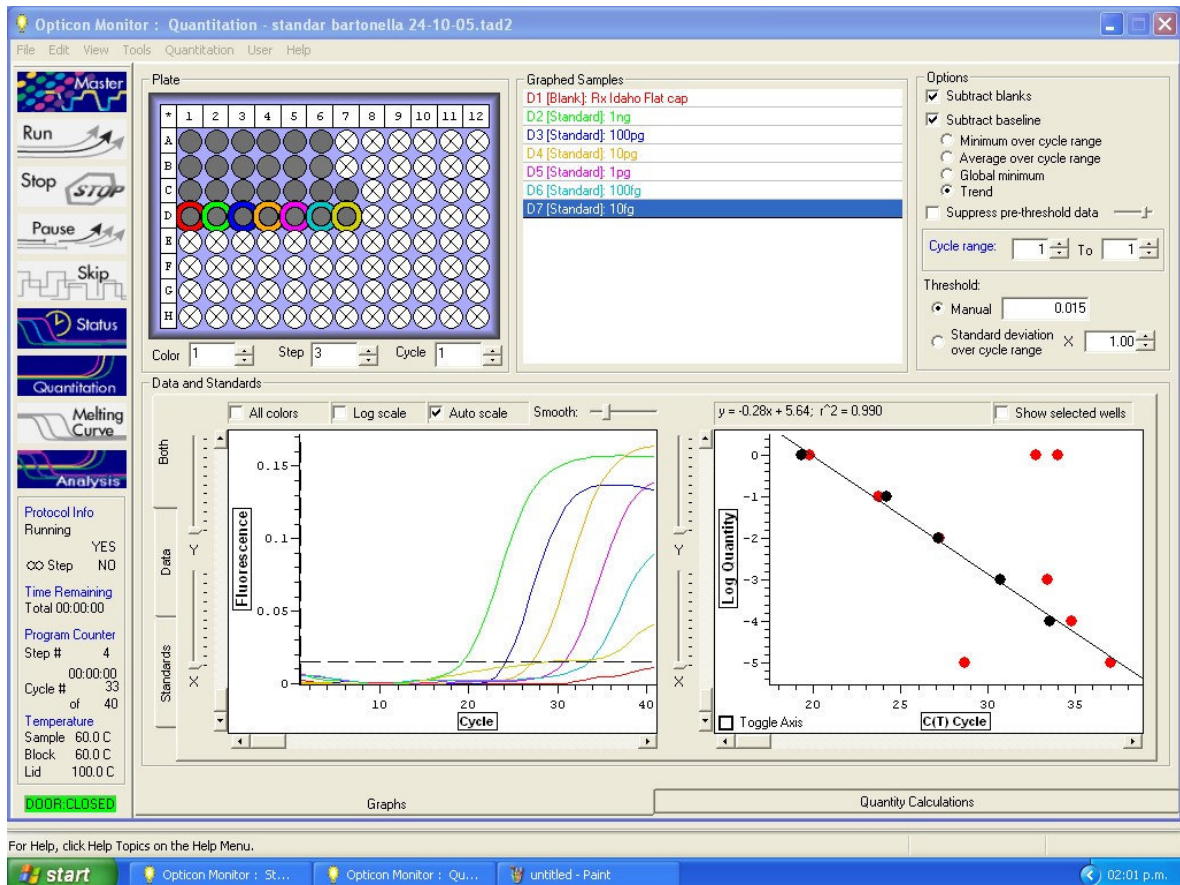
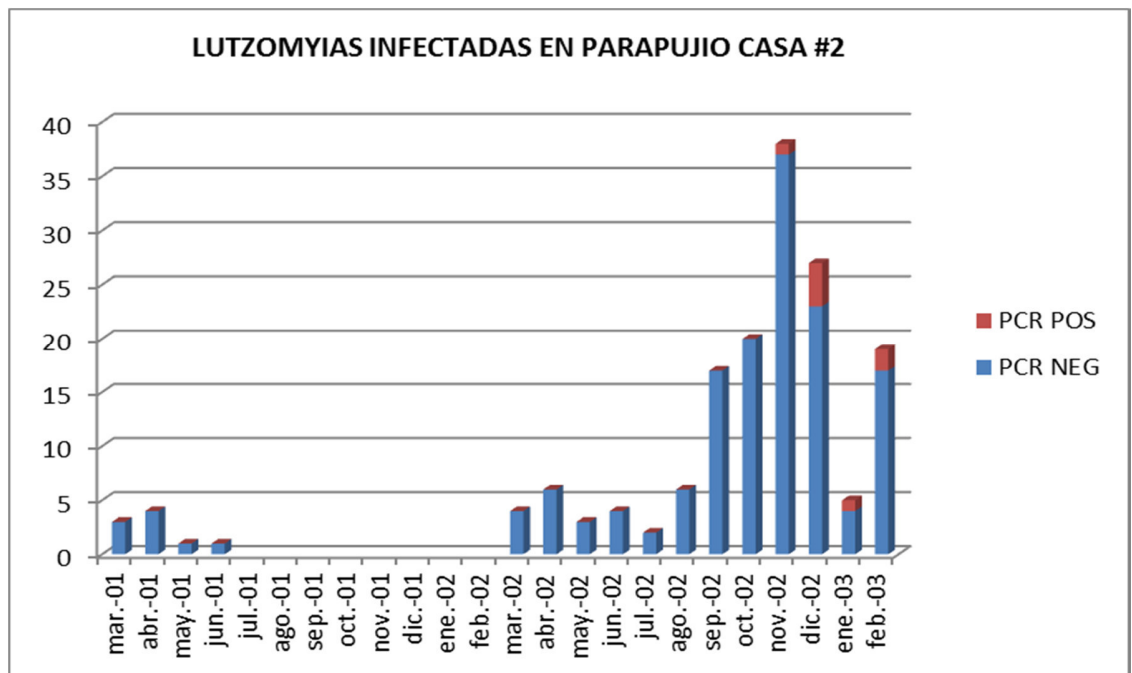


Figura 22. Curva estándar

Cualquier resultado cuestionable fue repetido para corroborar el resultado, generalmente estos resultados llegaron a ser francamente positivo. Se corrieron un total de 627 pooles de muestras. Se pudo realizar el análisis cuantitativo de las

muestras positivas ya que en cada corrida se corrió controles y estándares a distintas concentraciones, así como se corrió muestras negativas para validar cada corrida. En todas las corridas se obtuvo los resultados esperados de los controles.

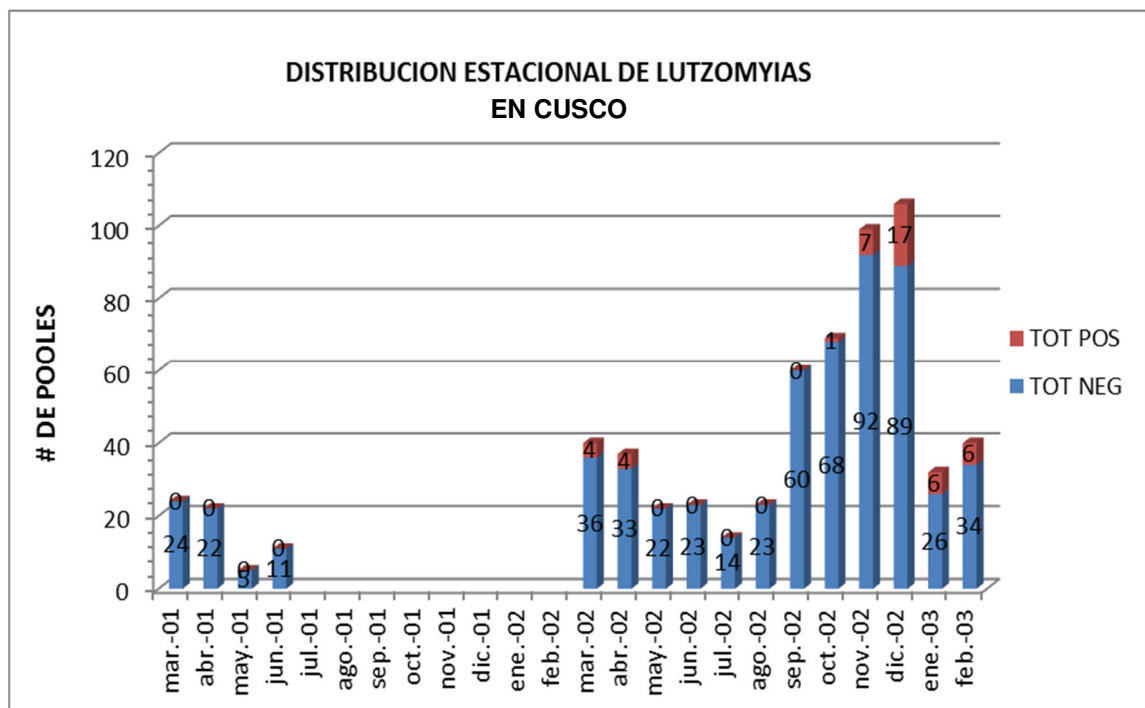
De todas las muestras positivas se observó lo siguiente: de los 46 muestras positivas, las casas con mayor número de pooles fueron Parapujio #2, que obtuvo mayor número de pooles de los cuales 160 fueron procesados, más pooles que cualquier otra casa y también tuvo la mayor cantidad de positivos 8(5%), seguido por la casa de Cusipata #1 que obtuvo 8 positivos de las 88 muestras procesadas una positividad del (9%). Siendo esta última casa la que genera más riesgo de infección.



Gráfica 1. Resultados de muestras de Casa #2

La distribución estacional de las muestras positivas fue de la siguiente manera: se procesó un total de 24 pooles del mes de marzo del 2001, sin positivos,

22 pooles del mes de abril, 5 pooles del mes de mayo y 11 del mes de junio del 2001. Se perdió información de los resultados del resto del 2001 tomando en cuenta que no hubo captura durante los meses de octubre a diciembre del 2001. Se corrió 36 pooles del mes de marzo del 2002, 33 pooles del mes de abril, 22 pooles del mes de mayo, 23 pooles del mes de junio, 14 pooles del mes de julio, 23 pooles del mes de agosto, 60 pooles del mes de septiembre, 69 pooles del mes de octubre, 99 pooles del mes de noviembre, 106 pooles del mes de diciembre del 2002, 32 pooles del mes de enero del 2003 y 40 pooles del mes de febrero del 2003.



Gráfica 2. Distribución estacional del estudio en Cusco

Discusión

El propósito de este estudio fue conocer el riesgo de infección por *Bartonella bacilliformis* a consecuencia de picaduras de titiras, como también conocer el riesgo estacional de lo mismo. Se pudo obtener una nueva herramienta de diagnóstico para detectar el vector infectado, como también conocer un poco más de su epidemiología y transmisión. Estos conocimientos nos ayudaran a dirigir nuestros recursos para prevenir la enfermedad.

Este procedimiento detecta cantidades muy pequeñas de DNA de *Bartonella*, ya que es una prueba muy sensible que nos ayudara a conocer el riesgo de infección tanto en zonas endémicas como en epidémicas.

Debido al tamaño de la *Bartonella bacilliformis* es muy fácil confundirla dentro de una *Lutzomyia* contaminada con bacterias, por lo que se hizo intentos de disección para encontrar las B.b pero no fue posible corroborar sin lugar a dudas. Estudios por Hertig en los 40's observaron bacterias microscópicamente en la proboscis que serían *Bartonella bacilliformis*. Se ha desarrollado diversas técnicas para poder corroborar dichos estudios sin embargo nada ha sido concluyente.

Es así que la Universidad de Servicios Uniformados se empezó con estudios en el 1995 para determinar el vector de la bartonelosis. Se empezó con PCR convencional usando el gene citrato sintetasa para detectar titiras infectadas. Este método requiere de concentraciones mayores de DNA limitando el alcance deseado para este estudio ya que se requiere de una alta sensibilidad y especificidad ya que la cantidad de DNA en una muestra de campo es muy pequeña. El PCR de tiempo real si es capaz de detectar *Lutzomyias* infectadas

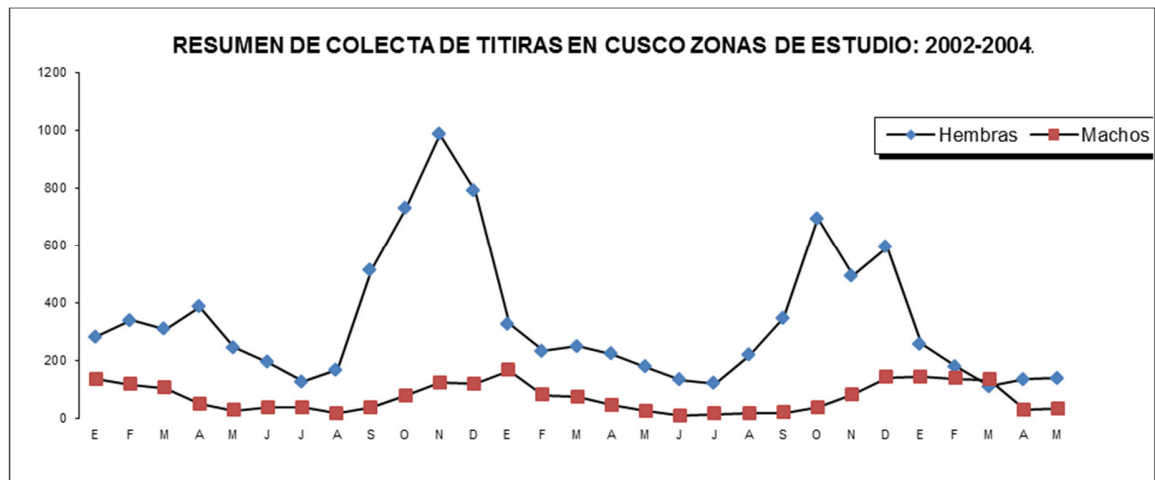
naturalmente y experimentalmente. Esta técnica se ha mejorado permitiendo estudiar organismos fastidiosos por su alta sensibilidad y rápido procesamiento.

Este procedimiento permite detectar DNA de *Bartonella bacilliformis* en concentraciones esperadas en Lutzomyias de tal manera que se pueda incriminar como vector de la bartonelosis sin lugar a dudas. En el primer estudio realizado se usó un juego de cebadores que dio la posibilidad de dar una reacción cruzada con DNA del cromosoma tres del humano cuando se usa el gen de citrato sintetasa como marcador. Este cromosoma fue detectado con ambos métodos PCR tiempo Real Time y con PCR convencional. En este estudio no se apreció ningún falso positivo debido a reacción cruzada al cromosoma tres ya que en todas los controles negativos nuestros resultados fueron negativos. En el estudio utilizando muestras de Caráz se pudo analizar el producto de la reacción cruzada y la secuencia de este dio un alineamiento perfecto con 222bp del cromosoma tres del humano. Una posible explicación de estos resultados positivos con solo algunas muestras humanas podría deberse a que se produzca una falsa reacción con el cromosoma 3 es que expresa algunas características normales de los sujetos y no son común para el resto de sujetos evaluados. Esta explicación está basada en el hecho que ambos sujetos que dieron reacción cruzada fueron Caucásicos mientras que las muestras negativas vinieron en su mayoría de individuos Hispánicos. Por lo que se recomienda secuenciar los amplicones para evitar falso positivos. En este estudio todas las muestras humanas corridas dieron negativo pero también es cierto que todos los sujetos son de origen hispánico, ninguno caucásico. Por lo que se recomienda usar esta prueba solo para fines epidemiológicos o como tamizaje en humanos. La población vulnerable en Cusco

son netamente turistas, muchos de ellos caucásicos por ello se recalca que su uso sería de tamizaje rápido.

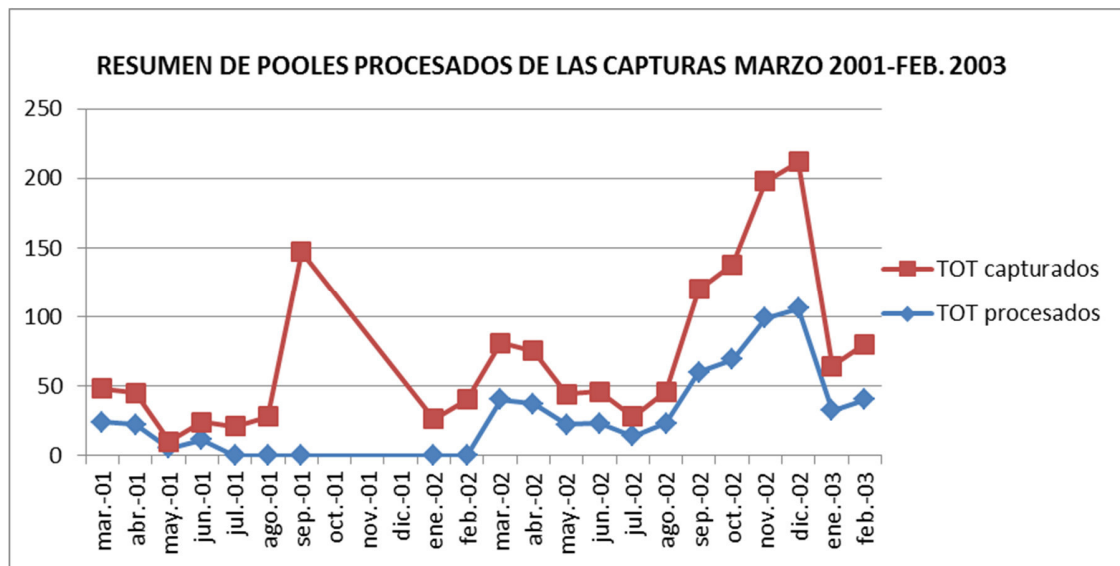
Se recomienda como una alternativa de secuenciar los amplicones o un método alternativo sería una segunda corrida de nuestras muestras positivas con un segundo juego de cebadores para un gen diferente del citrato sintetasa, como el gen de riboflavin (*ribC*) que las referencia afirman que no amplifica DNA humano (Bereswill et al. 1999; Johnson et al. 2003; Zeater et al. 2003).

Una de la metas de este estudio no se pudieron cumplir como es analizar los ciclos de infección de *Bartonella* en sus variaciones estacionales durante varios años consecutivos, ya que no se disponía muestras de algunos meses. Se logró correr todas las muestras recolectadas pero luego de sufrir el robo de la laptop donde se encontraba los resultados, no se pudo recuperar la totalidad de la data ya que el Chromo 4 donde se hizo las corridas sufrió un desperfecto, que genero reparar el disco duro perdiendo la información ya que se tuvo que reinstalar el programa. Sin embargo se dispone información de doce meses consecutivos y algunos meses más, lo cual nos da información suficiente para basarnos en variación estacional de un año entero y estimar el patrón de infección que se podría comportar de la misma manera con la información de las muestras capturadas.



Gráfica 3. Recolección total de muestras de Cusco

La gráfica de resumen de colecta nos demuestra que la población de titiras aumenta en los meses de setiembre a diciembre. Por lo que los datos obtenidos en este estudio se pueden extrapolar a los años siguientes. Siendo el periodo en mención del 2002 el de mayor numero de captura, año que fue procesado en su totalidad como se muestra en el gráfica siguiente.



Gráfica 4. Resumen de muestras procesadas vs capturadas

Se trabajó las muestras en un estudio ciego, los viales numerados no reflejan el lugar, ni fecha de la colección de las titiras. Por lo que no se supo hasta el término del procesamiento de pooles y el inicio del análisis dicha información. Al descubrir la información de las muestras nos dio información interesante.

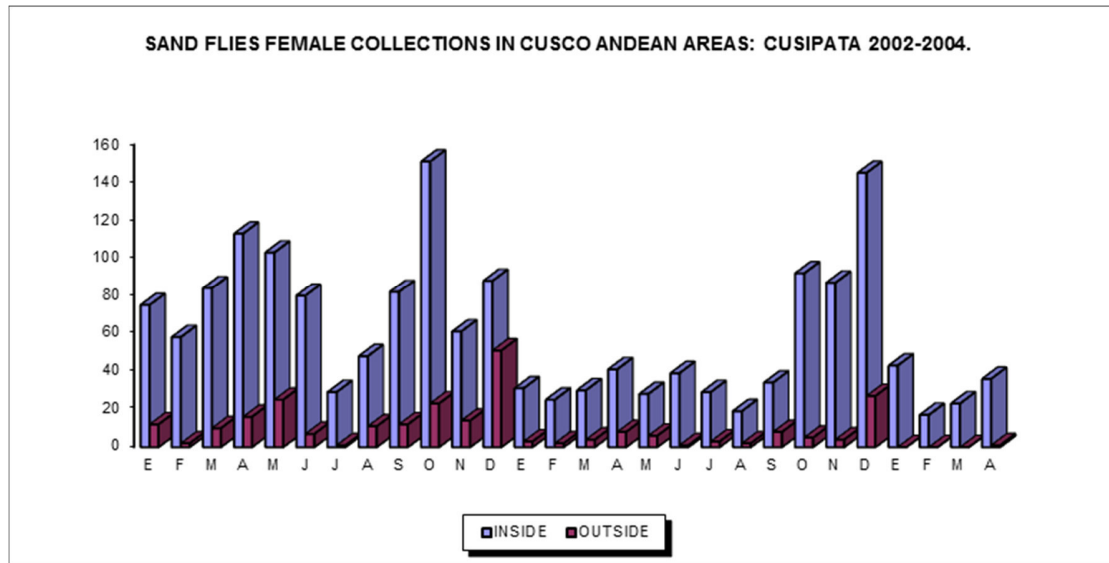
Las muestras positivas vinieron de las casas: Cusipata #1, #2; #4, Moccoraíse #1, #6, Parapujio #1, #2, #4 y #5

Las muestras no positivas vinieron de casas Cusipata #3 #5; Moccoraíse #2, #3, #5, #7, #9.

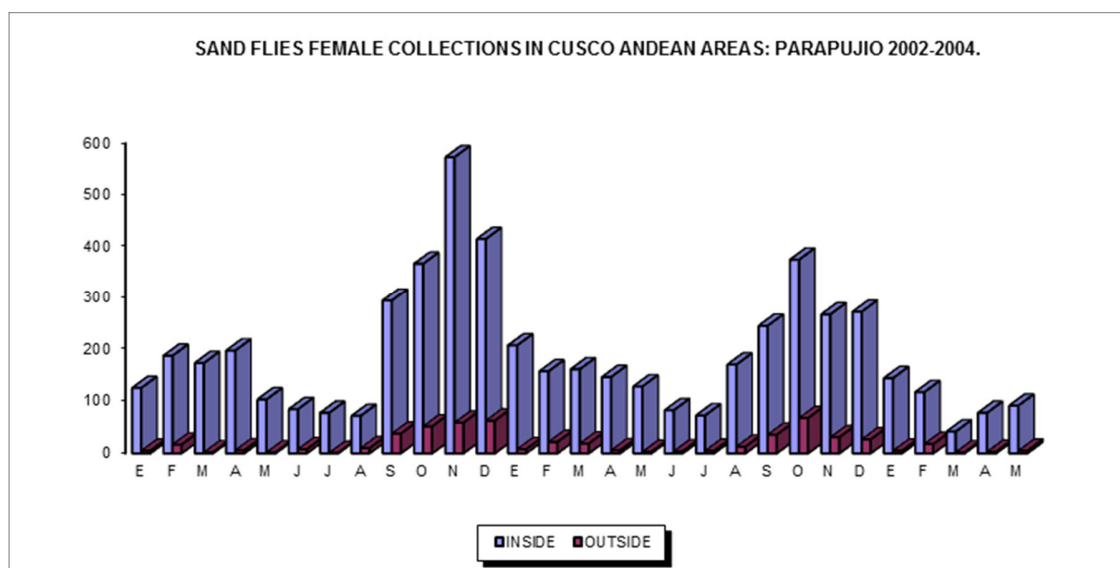
El rango de infección de *Lutzomyias* fue de 7.18% de los especímenes sin sangre en su tracto digestivo. La incidencia de los moscos infectados (PCR positivos) puede variar de acuerdo a las pocas muestras procesadas de las casas de pacientes y aún menor número de muestras en las casas de no pacientes.

Se debe notar que la mayoría de muestras positivas vinieron de las mismas casas dónde se recolectó el mayor número de titiras. Si se toma en cuenta la información de cada casa se obtendría resultados variados. Cuando se comparan los resultados de las casas se obtuvo que la mayor positividad se dio en el mes de diciembre del 2002.

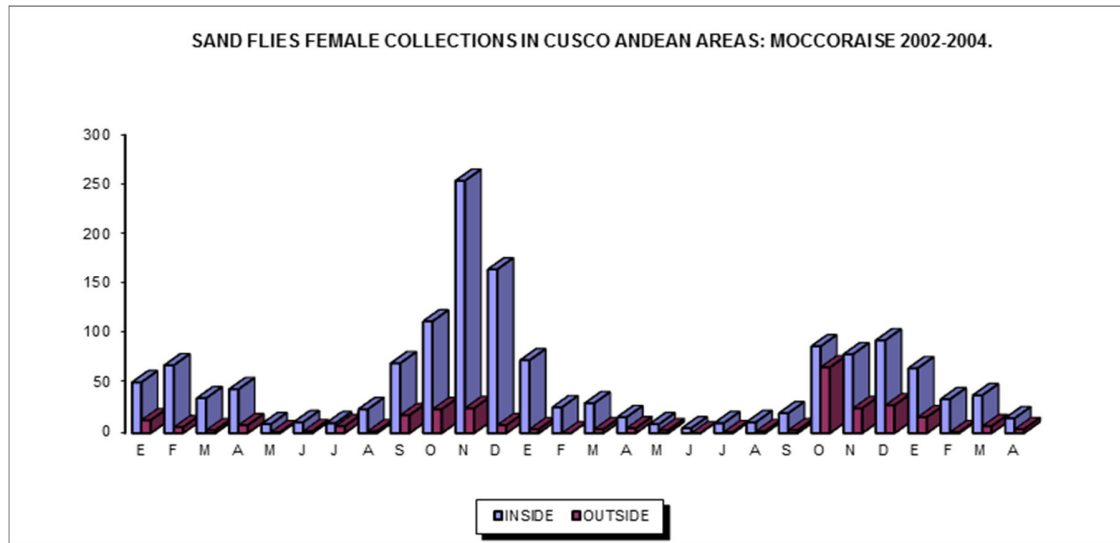
Se deberá realizar nuevas colectas en años consecutivos y correr estas muestras para confirmar esta información. Ya que no se corrieron un mayor número de muestras de otros años no se puede asegurar este dato de variación estacional. Los porcentajes intradomiciliarios fueron mucho mayores que los extradomiciliarios por lo que la prevención se debe focalizar en las casas de las poblaciones afectadas.



Gráfica 5. Recoleccion de Lutzomyias en Cusipata. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez



Gráfica 6. Recoleccion de Lutzomyias en Parapujio. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez



Gráfica 7. Recoleccion de Lutzomyias en Moccoraise. Cortesia Phillip Lawyer y Roberto Fernandez

Estos datos de variación estacional se podrán ratificar corriendo un número apropiado de titiras de cada mes tomando en cuenta el porcentaje de rango de incidencia. Esta información ayudara a comprender mejor la relación de esta enfermedad en cuanto a la epidemiología y la relación de mosquitos infectados con los pacientes positivos. Nuestra data muestra que los moscos pueden infectarse con *Bartonella* luego de alimentarse con sangre infectada. Este trabajo provee los métodos para futuros estudios para determinar infección de Lutzomyias en otras comunidades.

Es posible que se produzca transmisión mecánica de patógenos cuando un vector transporta organismos, como bacterias que pueden causar diarreas al transportar bacterias en los pelos del hospedero. Se debe descartar también la inoculación directa de glóbulos rojos infectados como una transmisión mecánica.

Este tipo de transmisión sería considerado más o menos incidental.

El rango de infección encontrada en este estudio es mucho más alto que los reportes realizados por PCR convencional por Gordon *et al.* (2000) e incluso a

los datos obtenidos del estudio de Caráz con PCR tiempo real. Otros estudios como el de; *Wolbachia* obtuvo (60 a 81%) con PCR (Benlarbi & Ready, 2003). En cuanto a *Leishmania* se obtuvo con PCR en tiempo real con un rango de infección de 2.9% (Svobodova et al, 2003). Los rangos de infección fueron de 11.1% para *Bartonella henselae* en pulgas (Rolain et al. 2003).

CONCLUSIONES

1. Se determinó que la prevalencia de infección de las Lutzomyias procesadas fue 7.18% de los especímenes sin sangre en su tracto digestivo. La incidencia de los moscos infectados (PCR positivos) puede variar de acuerdo al número de muestras procesadas.
2. Los resultados nos revelan que aumentan el número de muestras positivas en el mes de noviembre, siendo el mes de diciembre, el mes con mayor positividad. Estos datos se correlacionan con el aumento de titiras en la zona.
3. Se reafirma que esta prueba es la indicada para este tipo de análisis ya que este PCR mostro una sensibilidad de 100% y una especificidad de 95.50% así como un vvalor predictivo positiva fue 87.50%.y valor predictivo negativo fue de 100%.La cantidad de DNA requerida es pequeña, 1-5 µl. Los preparados de DNA de las titiras, aun cuando extraídos luego de alimentarse con sangre, no contenían sustancias inhibitorias para PCR. Por lo que se establece que nuestro protocolo de extracción de DNA fue bueno y da una buena base para futuros protocolos.

Recomendaciones

Como resultado de este estudio se determinó que se debe de preferencia fumigar entre los meses de noviembre a diciembre de cada año época que se encuentra el mayor número de lutzomyas infectadas para así evitar futuros brotes.

Nuevamente se demuestra que esta prueba es una herramienta valiosa para determinar los rangos de infección de *Bartonella bacilliformis* en titiras capturadas tanto en áreas endémicas como epidémicas del Perú. Dado al tamaño del genoma de *Bartonella bacilliformis* en 5MB. Por lo que nuestro ensayo detecta de 2-20 copias de la secuencia blanco en los pooles. Adicionalmente se pudo comprobar que esta metodología, y que el equipo utilizado permitió procesar un gran número de muestras, hasta 96, muy útil para estudios epidemiológicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes equipos utilizados se recomienda usar reactivos específicos para cada uno de tal manera se obtenga resultados precisos y dentro de los rangos esperados ya que todos ellos presentan ventajas diferentes.

Se recomienda estandarizar esta prueba usando un juego de cebadores usando el gen de riboflavin (*ribC*) ya que no amplifica el gen humano (Bereswill et al. 1999; Johnson et al. 2003; Zeater et al. 2003). Así se tendría una herramienta diagnóstica rápida para determinar si un paciente está infectado con *Bartonella*.

APENDICE

Se incluye los resultados de las muestras procesadas en su totalidad para que sirva de referencia en caso se desee replicar este trabajo en zonas donde aún no

se sabe el porcentaje de infectividad del vector y poder proporcionar concentraciones de lo que se encuentra en su medio natural.

Tabla 4. Tabla de resultados

Fecha muestra	Muestra/casa	Código	C(T)	(C) pg	PCR
04-mar-01	Cusipata #1	CUS0001	None	N/A	Neg
05-mar-01	Cusipata #2	CUS0005	None	N/A	Neg
05-mar-01	Cusipata #4	CUS0007	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #1	CUS0010	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #1	CUS0011	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #2	CUS0012	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #2	CUS0013	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #3	CUS0015	None	N/A	Neg
07-mar-01	Cusipata #4	CUS0017	None	N/A	Neg
12-mar-01	Parapujio #5	CUS0022	None	N/A	Neg
13-mar-01	Parapujio #1	CUS0024	None	N/A	Neg
13-mar-01	Parapujio #5	CUS0026	None	N/A	Neg
13-mar-01	Parapujio #2	CUS0028	None	N/A	Neg
13-mar-01	Parapujio #4	CUS0030	None	N/A	Neg
14-mar-01	Parapujio #2	CUS0033	None	N/A	Neg
14-mar-01	Parapujio #1	CUS0035	None	N/A	Neg
14-mar-01	Parapujio #4	CUS0036	None	N/A	Neg
14-mar-01	Parapujio #5	CUS0037	None	N/A	Neg
14-mar-01	Parapujio #2	CUS0038	None	N/A	Neg
19-mar-01	Moccoraise #5	CUS0043	None	N/A	Neg
20-mar-01	Moccoraise #2	CUS0045	None	N/A	Neg
21-mar-01	Moccoraise #2	CUS0046	None	N/A	Neg
21-mar-01	Moccoraise #5	CUS0055	None	N/A	Neg
22-mar-01	Moccoraise #3	CUS0047	None	N/A	Neg
02-abr-01	Cusipata #4	CUS0058	None	N/A	Neg
03-abr-01	Cusipata #1	CUS0059	None	N/A	Neg
03-abr-01	Cusipata #2	CUS0060	None	N/A	Neg
04-abr-01	Cusipata #1	CUS0067	None	N/A	Neg
04-abr-01	Cusipata #2	CUS0069	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #2	CUS0071	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #4	CUS0075	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #5	CUS0077	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #2	CUS0079	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #2	CUS0080	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #1	CUS0081	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #4	CUS0083	None	N/A	Neg

10-abr-01	Parapujio #4	CUS0084	None	N/A	Neg
10-abr-01	Parapujio #5	CUS0085	None	N/A	Neg
11-abr-01	Parapujio #2	CUS0086	None	N/A	Neg
11-abr-01	Parapujio #1	CUS0088	None	N/A	Neg
11-abr-01	Parapujio #4	CUS0089	None	N/A	Neg
11-abr-01	Parapujio #5	CUS0090	None	N/A	Neg
11-abr-01	Parapujio #5	CUS0094	None	N/A	Neg
17-abr-01	Moccoraise #1	CUS0096	None	N/A	Neg
17-abr-01	Moccoraise #1	CUS0096	None	N/A	Neg
17-abr-01	Moccoraise #2	CUS0098	None	N/A	Neg
15-may-01	Parapujio #5	CUS0129	None	N/A	Neg
15-may-01	Parapujio #1	CUS0130	None	N/A	Neg
16-may-01	Parapujio #1	CUS0134	None	N/A	Neg
16-may-01	Parapujio #2	CUS0135	None	N/A	Neg
16-may-01	Parapujio #5	CUS0137	None	N/A	Neg
05-jun-01	Cusipata #1	CUS0150	None	N/A	Neg
05-jun-01	Cusipata #4	CUS0152	None	N/A	Neg
06-jun-01	Cusipata #1	CUS0156	None	N/A	Neg
06-jun-01	Cusipata #2	CUS0158	None	N/A	Neg
06-jun-01	Cusipata #3	CUS0159	None	N/A	Neg
06-jun-01	Cusipata #4	CUS0160	None	N/A	Neg
11-jun-01	Parapujio #4	CUS0165	None	N/A	Neg
12-jun-01	Parapujio #1	CUS0167	None	N/A	Neg
12-jun-01	Parapujio #2	CUS0168	None	N/A	Neg
12-jun-01	Parapujio #5	CUS0170	None	N/A	Neg
12-jun-01	Parapujio #5	CUS0174	None	N/A	Neg
04-mar-02	Cusipata #1	CUS640	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #1	645(5)	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #1	645(2)	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #2	647	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #2	648	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #4	649	34,041	0,147775	POS
05-mar-02	Cusipata #1	653(2)	30,208	0,991676	POS
05-mar-02	Cusipata #2	655	None	N/A	Neg
05-mar-02	Cusipata #1	659	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #1	663(5)	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #1	664	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #2	665(3)	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #2	666	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #4	667	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #5	670	None	N/A	Neg
06-mar-02	Cusipata #4	674	None	N/A	Neg
11-mar-02	Parapujio #2	677	None	N/A	Neg
11-mar-02	Parapujio #5	679	13,002	5105,44	POS
12-mar-02	Parapujio #1	680	None	N/A	Neg
12-mar-02	Parapujio #2	682(4)	None	N/A	Neg

12-mar-02	Parapujio #4	684	None	N/A	Neg
12-mar-02	Parapujio #5	686	37,709	N/A	Neg
12-mar-02	Parapujio #4	690	None	N/A	Neg
12-mar-02	Parapujio #1	692	None	N/A	Neg
13-mar-02	Parapujio #2	698	None	N/A	Neg
13-mar-02	Parapujio #4	700	None	N/A	Neg
13-mar-02	Parapujio #5	702	None	N/A	Neg
13-mar-02	Parapujio #2	705	None	N/A	Neg
13-mar-02	Parapujio #5	707	None	N/A	Neg
19-mar-02	Moccoraise #1	712	38,41	N/A	Neg
19-mar-02	Moccoraise #1	713	None	N/A	Neg
19-mar-02	Moccoraise #3	714	None	N/A	Neg
19-mar-02	Moccoraise #6	716	None	N/A	Neg
19-mar-02	Moccoraise #6	722	34,875	0,0976383	POS
19-mar-02	Moccoraise #7	723	None	N/A	Neg
20-mar-02	Moccoraise #1	728	None	N/A	Neg
20-mar-02	Moccoraise #1	729	None	N/A	Neg
20-mar-02	Moccoraise #6	732	None	N/A	Neg
20-mar-02	Moccoraise #6	733	None	N/A	Neg
20-mar-02	Moccoraise #7	734	None	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #1	745P1	16,958	715,573	POS
09-abr-02	Cusipata #1	745P2	38,41	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #1	745P3	10,916	14393,1	POS
09-abr-02	Cusipata #1	746	None	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #2	747	None	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #2	748	None	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #4	749	36,36	0,0467041	POS
09-abr-02	Cusipata #5	752	None	N/A	Neg
09-abr-02	Cusipata #1	759	None	N/A	Neg
10-abr-02	Cusipata #1	763	None	N/A	Neg
10-abr-02	Cusipata #2	765	None	N/A	Neg
10-abr-02	Cusipata #2	766	None	N/A	Neg
10-abr-02	Cusipata #4	767	None	N/A	Neg
15-abr-02	Parapujio #1	776	None	N/A	Neg
15-abr-02	Parapujio #2	777	None	N/A	Neg
15-abr-02	Parapujio #4	778	None	N/A	Neg
15-abr-02	Parapujio #5	779	37,267	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #1	780	None	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #1	781	37,6	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #2	782P1	39,428	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #2	782P2	None	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #2	783	None	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #4	784	None	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #5	786	None	N/A	Neg
16-abr-02	Parapujio #5	791	None	N/A	Neg

17-abr-02	Parapujio #1	796	None	N/A	Neg
17-abr-02	Parapujio #2	798	None	N/A	Neg
17-abr-02	Parapujio #4	800	None	N/A	Neg
17-abr-02	Parapujio #4	801	None	N/A	Neg

17-abr-02	Parapujio #5	802	None	N/A	Neg
17-abr-02	Parapujio #2	805	None	N/A	Neg
22-abr-02	Moccoraise #1	808	28,184	2,71028	POS
23-abr-02	Moccoraise #1	812	None	N/A	Neg
23-abr-02	Moccoraise #1	813	None	N/A	Neg
23-abr-02	Moccoraise #6	816	None	N/A	Neg
23-abr-02	Moccoraise #7	818	None	N/A	Neg
24-abr-02	Moccoraise #6	832	None	N/A	Neg
06-may-02	Cusipata #1	841	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	845P1	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	845P2	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	845P3	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #2	847	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #5	851	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	853	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	854	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #2	855	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	858	None	N/A	Neg
07-may-02	Cusipata #1	859	None	N/A	Neg
08-may-02	Cusipata #1	863	None	N/A	Neg
08-may-02	Cusipata #5	869	None	N/A	Neg
13-may-02	Parapujio #2	877	None	N/A	Neg
13-may-02	Parapujio #4	878	None	N/A	Neg
14-may-02	Parapujio #2	882	None	N/A	Neg
14-may-02	Parapujio #5	886	None	N/A	Neg
14-may-02	Parapujio #1	892	None	N/A	Neg
15-may-02	Parapujio #2	898	None	N/A	Neg
15-may-02	Parapujio #4	900	None	N/A	Neg
15-may-02	Parapujio #5	902	None	N/A	Neg
22-may-02	Moccoraise #1	928	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #1	945P1	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #1	945P2	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #1	945P3	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #1	945P4	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #1	946	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #2	947	None	N/A	Neg
04-jun-02	Cusipata #4	949	None	N/A	Neg
05-jun-02	Cusipata #1	963P1	None	N/A	Neg
05-jun-02	Cusipata #1	963P2	None	N/A	Neg
05-jun-02	Cusipata #1	963P3	None	N/A	Neg
05-jun-02	Cusipata #1	964	None	N/A	Neg

05-jun-02	Cusipata #2	965	None	N/A	Neg
05-jun-02	Cusipata #2	966	None	N/A	Neg
10-jun-02	Parapujio #2	977	None	N/A	Neg
11-jun-02	Parapujio #1	981	None	N/A	Neg
11-jun-02	Parapujio #2	983	None	N/A	Neg
11-jun-02	Parapujio #5	986	None	N/A	Neg
11-jun-02	Parapujio #2	993	None	N/A	Neg
12-jun-02	Parapujio #1	997	None	N/A	Neg

12-jun-02	Parapujio #2	998	None	N/A	Neg
12-jun-02	Parapujio #4	1000	None	N/A	Neg
18-jun-02	Moccoraise #1	1013	None	N/A	Neg
19-jun-02	Moccoraise #6	1032	None	N/A	Neg
03-jul-02	Cusipata #1	1063	None	N/A	Neg
03-jul-02	Cusipata #2	1065	None	N/A	Neg
09-jul-02	Parapujio #1	1080	39,056	N/A	Neg
09-jul-02	Parapujio #2	1082	None	N/A	Neg
09-jul-02	Parapujio #1	1088	None	N/A	Neg
10-jul-02	Parapujio #5	1095	None	N/A	Neg
10-jul-02	Parapujio #2	1098	None	N/A	Neg
10-jul-02	Parapujio #5	1102	None	N/A	Neg
23-jul-02	Moccoraise #6	1116	None	N/A	Neg
23-jul-02	Moccoraise #7	1118	None	N/A	Neg
23-jul-02	Moccoraise #7	1119	None	N/A	Neg
24-jul-02	Moccoraise #1	1129	None	N/A	Neg
24-jul-02	Moccoraise #3	1131	None	N/A	Neg
24-jul-02	Moccoraise #6	1133	None	N/A	Neg
05-ago-02	Cusipata #1	1141	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #1	1145P1	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #1	1145P2	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #1	1145P3	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #4	1149	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #4	1150	None	N/A	Neg
06-ago-02	Cusipata #1	1154	None	N/A	Neg
12-ago-02	Parapujio #2	1177	None	N/A	Neg
13-ago-02	Parapujio #1	1180	None	N/A	Neg
13-ago-02	Parapujio #2	1182(5)	None	N/A	Neg
13-ago-02	Parapujio #2	1182(2)	None	N/A	Neg
13-ago-02	Parapujio #5	1186	38,868	N/A	Neg
13-ago-02	Parapujio #5	1187	None	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #5	1195	None	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #1	1197	None	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #2	1198(5)	None	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #2	1198(1)	37,396	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #2	1199	None	N/A	Neg
14-ago-02	Parapujio #5	1202	None	N/A	Neg

19-ago-02	Moccoraise #1	1208	None	N/A	Neg
20-ago-02	Moccoraise #1	1212	None	N/A	Neg
21-ago-02	Moccoraise #1	1229	None	N/A	Neg
21-ago-02	Moccoraise #6	1232	None	N/A	Neg
03-sep-02	Cusipata #1	1245	None	N/A	Neg
03-sep-02	Cusipata #2	1248	None	N/A	Neg
03-sep-02	Cusipata #1	1253	None	N/A	Neg
03-sep-02	Cusipata #1	1254	None	N/A	Neg
04-sep-02	Cusipata #1	1263(5)	None	N/A	Neg
04-sep-02	Cusipata #1	1263(1)	None	N/A	Neg
04-sep-02	Cusipata #4	1267	None	N/A	Neg
04-sep-02	Cusipata #4	1268	None	N/A	Neg

04-sep-02	Cusipata #4	1274	None	N/A	Neg
09-sep-02	Parapujio #1	1276	None	N/A	Neg
09-sep-02	Parapujio #2	1277(5)	None	N/A	Neg
09-sep-02	Parapujio #2	1277	None	N/A	Neg
09-sep-02	Parapujio #4	1278	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #1	1280(5)	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #1	1280(1)	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #1	1281	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P1	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P2	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P3	37,304	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P4	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P5	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P6	38,753	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1282P7	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1283	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #5	1286(5)	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #5	1286(2)	None	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #5	1287	38,466	N/A	Neg
10-sep-02	Parapujio #2	1289	39,288	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1298P1	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1298P2	38,787	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1298P3	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1298P4	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1296	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1297P1	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1297P2	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1297P3	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1297P4	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #1	1297P5	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1299	38,135	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #4	1300	38,6	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #4	1301	None	N/A	Neg

11-sep-02	Parapujio #5	1302P1	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #5	1302P2	None	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #5	1302P3	38,724	N/A	Neg
11-sep-02	Parapujio #2	1305	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1313	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1316	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1317	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1318	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1320	None	N/A	Neg
17-sep-02	Moccoraise #6	1326	38,198	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #1	1328	None	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #1	1329	None	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #3	1330	38,618	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #3	1331	39,279	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #6	1332	None	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #7	1334	None	N/A	Neg

18-sep-02	Moccoraise #7	1335	None	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #1	1336	None	N/A	Neg
18-sep-02	Moccoraise #6	1338	None	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #1	1345	None	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #1	1345(4)	None	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #2	1347	37,88	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #4	1349	38,599	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #4	1350	38,304	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #1	1354	None	N/A	Neg
08-oct-02	Cusipata #1	1359	None	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #1	1363P1	39,315	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #1	1363P2	38,295	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #1	1363P3	38,684	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #1	1363P4	None	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #4	1367	None	N/A	Neg
09-oct-02	Cusipata #2	1366	23.600	26,8908	POS
14-oct-02	Parapujio #1	1376	None	N/A	Neg
14-oct-02	Parapujio #2	1377	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P1	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P2	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P3	37,102	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P4	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P5	39,69	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1381P6	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #5	1379	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1380	38,524	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P1	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P2	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P3	None	N/A	Neg

15-oct-02	Parapujio #2	1382P4	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P5	37,365	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P6	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P7	39,553	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1382P8	39,288	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1383	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1384	38,532	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #5	1386	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #5	1387	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #1	1388	38,359	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1389	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #4	1390	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #5	1391	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #2	1393	None	N/A	Neg
15-oct-02	Parapujio #4	1394	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #1	1396	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1398P1	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1398P2	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1398P3	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1398P4	None	N/A	Neg

16-oct-02	Parapujio #2	1398P5	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1399	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #4	1400	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #5	1402	None	N/A	Neg
16-oct-02	Parapujio #2	1405	None	N/A	Neg
21-oct-02	Moccoraise #1	1408	None	N/A	Neg
21-oct-02	Moccoraise #6	1410	None	N/A	Neg
21-oct-02	Moccoraise #7	1411	None	N/A	Neg
22-oct-02	Moccoraise #1	1412	None	N/A	Neg
22-oct-02	Moccoraise #1	1413	None	N/A	Neg
22-oct-02	Moccoraise #3	1414	37,079	N/A	Neg
22-oct-02	Moccoraise #6	1416	None	N/A	Neg
22-oct-02	Moccoraise #7	1418	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #1	1429	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #3	1431	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #6	1432(5)	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #6	1432(1)	36,517	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #6	1433	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #7	1434	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #7	1435	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #1	1436	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #6	1438	None	N/A	Neg
23-oct-02	Moccoraise #7	1439	None	N/A	Neg
11-nov-02	Cusipata #1	1441	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #1	1445(5)	None	N/A	Neg

12-nov-02	Cusipata #1	1445(3)	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #1	1446	37,067	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #2	1447	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #2	1448	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #4	1449	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #4	1450	None	N/A	Neg
12-nov-02	Cusipata #1	1459	36,134	0,0317735	POS
13-nov-02	Cusipata #1	1463(5)	None	N/A	Neg
13-nov-02	Cusipata #1	1463(1)	None	N/A	Neg
13-nov-02	Cusipata #1	1464	None	N/A	Neg
13-nov-02	Cusipata #4	1467	None	N/A	Neg
13-nov-02	Cusipata #4	1468	None	N/A	Neg
13-nov-02	Cusipata #5	1469	None	N/A	Neg
18-nov-02	Cusipata #1	1474	None	N/A	Neg
18-nov-02	Parapujio #1	1476	None	N/A	Neg
18-nov-02	Parapujio #2	1477(5)	37,252	N/A	Neg
18-nov-02	Parapujio #2	1477(4)	None	N/A	Neg
18-nov-02	Parapujio #5	1479	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1480P1	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1480P2	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1480P3	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1481(5)	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1481(4)	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1483(5)	None	N/A	Neg

19-nov-02	Parapujio #2	1483(3)	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P1	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P2	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P3	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P4	37,241	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P5	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P6	35,412	0,0478228	POS
19-nov-02	Parapujio #2	1482P7	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P8	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P9	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P10	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P11	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P12	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P13	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1482P14	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #4	1484	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #5	1486P1	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #5	1486P2	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #5	1486P3	19,204	469,273	POS
19-nov-02	Parapujio #5	1487	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1488	None	N/A	Neg

19-nov-02	Parapujio #2	1489	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #5	1491	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #1	1492	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #2	1493	None	N/A	Neg
19-nov-02	Parapujio #5	1495	36,032	0,0336627	POS
20-nov-02	Parapujio #1	1496	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #1	1496	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #1	CUS1497P1	6.520	umbral	Neg
20-nov-02	Parapujio #1	CUS1497P2	24.027	2,71264	POS
20-nov-02	Parapujio #1	CUS1497P3	23.311	26,73300	POS
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P1	1.680	umbral	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P2	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P3	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P4	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P5	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P6	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P7	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P8	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P9	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P10	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P11	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P12	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P13	3.466	umbral	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	CUS1498P14	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	1499P1	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	1499 5a	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	1499 5b	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #5	1502	None	N/A	Neg

20-nov-02	Parapujio #1	1504	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #2	1505	None	N/A	Neg
20-nov-02	Parapujio #5	1507	None	N/A	Neg
25-nov-02	Moccoraise #7	1511	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #1	1512	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #1	1513	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #3	1515	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #6	1517	32.739	0,32401	POS
26-nov-02	Moccoraise #7	1518	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #7	1519	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #1	1524	None	N/A	Neg
26-nov-02	Moccoraise #6	1526	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #1	1528	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #1	1529	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #3	1530	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1532P1	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1532P2	None	N/A	Neg

27-nov-02	Moccoraise #6	1532P3	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1532P4	6.123	umbral	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1532P5	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1533	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #7	1534	None	N/A	Neg
27-nov-02	Moccoraise #6	1538	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #1	1545P1	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #1	1545P2	35.133	0.0340227	POS
03-dic-02	Cusipata #1	1545P3	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #1	1545P4	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #2	1547	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #2	1548	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #4	1549	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #4	1550	2.092	umbral	Neg
03-dic-02	Cusipata #5	1551	7.628	umbral	Neg
03-dic-02	Cusipata #5	1552	None	N/A	Neg
03-dic-02	Cusipata #1	1554	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1563P1	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1563P2	38.730	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1563P3	37.723	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1563P4	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1564P1	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1564P2	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1564P3	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #2	1565P1	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #2	1565P2	27.081	28,8696	POS
04-dic-02	Cusipata #2	1566	3.640	umbral	Neg
04-dic-02	Cusipata #4	1568	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #5	1569	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #5	1570	None	N/A	Neg
04-dic-02	Cusipata #1	1571	None	N/A	Neg
09-dic-02	Parapujio #1	1576	None	N/A	Neg

09-dic-02	Parapujio #2	1577	None	N/A	Neg
09-dic-02	Parapujio #5	1579	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #2	CUS1583	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #4	CUS1585	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	CUS1586P1	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	CUS1586P2	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #1	CUS1588	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	CUS1587	4.387	umbral	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	CUS1591	7.398	umbral	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	CUS1595	21.238	97,817	POS
10-dic-02	Parapujio #1	1580P1	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #1	1580P2	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #1	1581P1	34.992	0,339249	POS

10-dic-02	Parapujio #1	1581P2	4.429	umbral	Neg
10-dic-02	Parapujio #2	1582P1	1.290	umbral	Neg
10-dic-02	Parapujio #2	1582P2	19.309	246,37	POS
10-dic-02	Parapujio #2	1582P3	27.806	2,92994	POS
10-dic-02	Parapujio #2	1583P1	24.154	27,1964	POS
10-dic-02	Parapujio #2	1583P2	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #4	1585	35.872	0,426432	POS
10-dic-02	Parapujio #5	1586P1	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	1586P2	37.147	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	1586P3	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	1587	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	1591	None	N/A	Neg
10-dic-02	Parapujio #5	1595	33.887	1,75473	POS
11-dic-02	Parapujio #1	CUS1596P1	33.266	0,9470	POS
11-dic-02	Parapujio #1	CUS1596P2	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	CUS1597	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P1	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P2	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P3	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P4	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P5	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P6	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P7	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1598P8	6.668	umbral	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1599	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #4	CUS1601	25.426	8,5392	POS
11-dic-02	Parapujio #5	CUS1602	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	CUS1604	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	CUS1605	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	1596P1	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	1596P2	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	1597	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P1	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P2	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P3	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P4	None	N/A	Neg

11-dic-02	Parapujio #2	1598P5	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P6	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P7	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1598P8	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #2	1599	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #5	1602	None	N/A	Neg
11-dic-02	Parapujio #1	1604	35.888	0,421761	POS
11-dic-02	Parapujio #2	1605	23.390	31,1459	POS
17-dic-02	Moccoraise #3	CUS1614	None	N/A	Neg

17-dic-02	Moccoraise #6	CUS1616	None	N/A	Neg
17-dic-02	Moccoraise #3	1614	None	N/A	Neg
17-dic-02	Moccoraise #6	1616	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #1	CUS1628	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #1	CUS1629	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #3	CUS1630	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #3	CUS1631	6.230	umbral	Neg
18-dic-02	Moccoraise #6	CUS1632P1	7.676	umbral	Neg
18-dic-02	Moccoraise #6	CUS1632P2	17.210	792,64	POS
18-dic-02	Moccoraise #6	CUS1632P3	20.608	94,91	POS
18-dic-02	Moccoraise #7	CUS1634	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #7	CUS1635	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #1	1628	34.487	0,11446	POS
18-dic-02	Moccoraise #1	1629	35.094	0,07423	POS
18-dic-02	Moccoraise #3	1630	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #3	1631	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #6	1632P1	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #6	1632P2	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #6	1632P3	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #7	1634	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #7	1635	None	N/A	Neg
18-dic-02	Moccoraise #1	1636	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #2	1642	33.527	2,2681	POS
13-ene-03	Cusipata #2	1647	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #2	1648	8.986	umbral	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1658	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1663	35.926	0,410286	POS
13-ene-03	Cusipata #1	1663P1	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #2	1665	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #2	1666	35.369	0,610421	POS
13-ene-03	Cusipata #4	1667	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1694	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1677	36.048	0,376165	POS
13-ene-03	Cusipata #1	1680	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1682P1	None	N/A	Neg
13-ene-03	Cusipata #1	1682P2	None	N/A	Neg
13-ene-03	Parapujio #1	1692	37.002	N/A	Neg
13-ene-03	Parapujio #2	1693	36.846	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #1	1697P1	37.308	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #1	1697P2	36.874	N/A	Neg

22-ene-03	Parapujio #2	1698P1	None	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #2	1698P2	None	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #2	1698P3	28.357	9,03705	POS
22-ene-03	Parapujio #5	1702	None	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #1	1704	None	N/A	Neg

22-ene-03	Parapujio #2	1705	None	N/A	Neg
22-ene-03	Parapujio #5	1707	None	N/A	Neg
28-ene-03	Moccoraise #1	1712(2)	36.206	0,33618	POS
28-ene-03	Moccoraise #1	1713	None	N/A	Neg
28-ene-03	Moccoraise #3	1714	None	N/A	Neg
28-ene-03	Moccoraise #3	1715	None	N/A	Neg
28-ene-03	Moccoraise #9	1718	None	N/A	Neg
29-ene-03	Moccoraise #1	1729	None	N/A	Neg
29-ene-03	Moccoraise #1	1736	None	N/A	Neg
04-feb-03	Cusipata #1	1745(4)	27.820	13,2445	POS
04-feb-03	Cusipata #2	1747(1)	None	N/A	Neg
04-feb-03	Cusipata #4	1749(4)	None	N/A	Neg
05-feb-03	Cusipata #2	1765	None	N/A	Neg
05-feb-03	Cusipata #4	1767(1)	None	N/A	Neg
10-feb-03	Parapujio #2	1777(1)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1789(3)	7.572	umbral	Neg
11-feb-03	Parapujio #5	1791(1)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1793(3)	14.433	1413,5	POS
11-feb-03	Parapujio #1	1780(1)	35.910	0,041506	POS
11-feb-03	Parapujio #4	1781(1)	35.769	0,458979	POS
11-feb-03	Parapujio #2	1782P1	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1782(1)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1783(2)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #5	1786P1	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #5	1787(1)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1498(3)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1532(4)	None	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1550	1.344	umbral	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1551	1.530	umbral	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1566	36.876	N/A	Neg
11-feb-03	Parapujio #2	1581(2)	35.082	0,74913	POS
11-feb-03	Parapujio #2	1581(1)	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #1	1796(1)	11.524	umbral	Neg
12-feb-03	Parapujio #1	1797(1)	7.642	umbral	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1798P1	4.510	umbral	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1798P2	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1798P3	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1798(2)	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1799(3)	39.953	0	Neg
12-feb-03	Parapujio #4	1800(1)	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #5	1802P1	37.165	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #5	1802(1)	None	N/A	Neg
12-feb-03	Parapujio #2	1805(1)	None	N/A	Neg
18-feb-03	Moccoraise #1	1812(1)	39.957	0	Neg
18-feb-03	Moccoraise #3	1814(2)	None	N/A	Neg
19-feb-03	Moccoraise #1	1828(2)	16.662	1224,4	POS

19-feb-03	Moccoraise #3	1830(1)	7.876	umbral	Neg
19-feb-03	Moccoraise #9	1834(1)	None	N/A	Neg
19-feb-03	Moccoraise #1	1836(1)	None	N/A	Neg

Glosario

Amplicón: Porción de ADN o ARN formado como productos de amplificación de una reacción en cadena de la polimerasa.

Antropofílico: Se dice del organismo que prefiere alimentarse o infectar al hombre.

Cebador: Una secuencia corta de oligonucleótidos que se utiliza en la reacción de PCR para la creación de moléculas más largas de ADN.

Codón: Una secuencia de tres nucleótidos en el ARNm que codifica para un aminoácido.

Concomitante: Que ocurre durante el mismo período de tiempo, generalmente referido a síntomas o enfermedades secundarios que se presentan con uno principal.

Ct: Número de ciclos en el cual la fluorescencia emitida supera el threshold. Esta inversamente correlacionado con el número de copias.

Dípteros: Insectos con un par de alas, (*dí* = dos, *ptera* = ala). Las alas posteriores (metatorácicas) se transforman en unos órganos llamados halterios o balancines, que no se utilizan para volar, sino para mantener la estabilidad mientras vuelan.

Endofágico: Dícese a los insectos con habito de alimentación al crepúsculo o noche dentro de los hogares.

Fluorocromo quencher: molécula en una sonda que bloquea su emisión de fluorescencia.

Fluorocromo reportador: Cromóforo fluorescente en el extremo 3' con diferentes longitudes de onda que permite simultáneamente la detección y cuantificación en una reacción.

Permetrina: Plaguicida sintético de amplio espectro perteneciente al grupo químico de los piretroides, cuyo mecanismo de acción es la neurotoxicidad. La permetrina es un piretroide de tercera generación. La permetrina se utiliza mundialmente como insecticida y acaricida.

Incriminación vectorial: La incriminación definitiva del vector requiere de la combinación de investigación de campo y de laboratorio para determinar la abundancia del vector por unidad de tiempo y espacio, patrones de selección del huésped, y cerrar el ciclo de infección con pruebas.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR cuantitativo: Uso de pcr para determinar la cantidad de ADN o ARN en una muestra; se utiliza frecuentemente para detectar mutaciones por delección o por duplicación.

Polimerasa: Enzimas que catalizan la síntesis de ácidos nucleicos en base a templados preexistentes.

Prevalencia: Proporción de personas de un grupo definido que están enfermas en un determinado momento

Probóscide: Órgano bucal de forma alargada, propio de algunos insectos, invertebrados marinos y otros animales, que les sirve para succionar alimentos.

Secuenciar: Determinación del orden de los nucleótidos en el ADN o ARN o el orden de los aminoácidos en las proteínas.

Sonda: Molécula de ADN o ARN monocatenario con una secuencia de bases específica, marcada radiactivamente o inmunológicamente, que se utiliza para detectar secuencias de bases complementarias por hibridación.

Threshold: Umbral en el que se produce un cambio significativo en la

fluorescencia.

Referencias

- Alexander, B. (1995). A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:354-359.
- Alexander B. & Marolli M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol.* Mar; 17(1): 1-18.
- Barbian K.D. & Minnick M.F. (2000). A bacteriophage-like particle from *Bartonella bacilliformis*. *Microbiology* 146:599-609.
- Battisti, J.M. & Minnick, M.F. (1999). Development of a System for Genetic Manipulation of *Bartonella bacilliformis*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65:3441-3448.
- Battistini, T. (1925). Contribución al estudio de la verruga peruana. Nota preliminar. *Anales de la Facultad de Medicina* (Lima) (Número extraordinario) 1925: 27 - 33.
- Bejarano EE, Sierra D. & Velez ID. (2003). New findings on the geographic distribution of the verrucarum group (Diptera: *Psychodidae*) in Colombia. *Biomedica.* Sep; 23(3):341-50.
- Benlarbi M. & Ready PD. (2003). Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of Leishmania. *Bull Entomol Res.* Oct; 93(5):383-91
- Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M. & Sander A. (1999). Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol.* Oct; 37(10):3159-66.
- Birtles RJ & Raoult D. (1996). Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species *Int J Syst Bact*, Vol 46, 891-897
- Buckles EL, McGinnis & Hill E. (2000). Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins. *Microb Pathog.* Sep; 29(3): 16574.
- Cáceres AG. (1993). Geographic distribution of *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector of human bartonellosis in Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Nov-Dec; 35(6): 485-90

Cáceres AG, Galati EA, Le Pont F. & Velasquez C. (1997). Possible role of *Lutzomyia maranonensis* and *Lutzomyia robusta* (Diptera: Psychodidae) as vectors of human bartonellosis in three provinces of region nor Oriental del Marañon, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Jan-Feb; 39(1): 51-2

Caceres-Rios H, Rodriguez-Tafur J, Bravo-Puccio F, Maguina-Vargas C, Diaz CS, Ramos DC. & Patarca R. (1995). Verruga peruana: an infectious endemic angiomatosis. *Crit Rev Oncog*. 6(1): 47-56.

Chamberlin, J., Laughlin, L., Gordon, S., **Romero, S.**, Solorzano, N. & Regnery, R. (2000). Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: Test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. *J. of Clinical Micro*. 38:4269-4271.

Chamberlin, J., Laughlin, L., **Romero, S.**, Solorzano, N. Gordon, S., Andre, R, Pachas, P., Friedman, H., Ponce, C., & Watts, D. (2002). Epidemiology of endemic *Bartonella bacilliformis*: A prospective cohort study in a Peruvian mountain valley community. *J. of Infectious Diseases*. 186:983-90.

Coleman, S.A. & Minnick, M.F. (2001). Establishing a Direct Role for the *Bartonella bacilliformis* Invasion-Associated locus B (*la1B*) protein in human Erythrocyte Parasitism. *Infect. Immun*. 69:4373-4381.

Cuadra M. & Takano J. (1969). The relationship of *Bartonella bacilliformis* to the red blood cell as revealed by electron microscopy. *Blood* 33(5):708-715

Ellis B.A., Rotz L.D., Leake J.A., Samalvides F., Bernable J., Ventura G., Padilla C., Villaseca P., Beati L., Regnery R., Childs J.E., Olson J.G. & Carrillo C.P. (1999). An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 61:344-349.

Goldenthal, M J., Marin-Garcia,J. & Ananthakrishnan R. (1998). Cloning and molecular analysis of the human citrate synthase gene. *Genome*, 41 (5): 7338

Gordon S, Andre R, Lawyer P, Fernandez R, Solorzano N, Marston E, Regnery R, Watts D & Laughlin L. (2000). Surveillance for *Bartonella bacilliformis* in biting arthropods from an endemic focus and the site of a recent epidemic in the Peruvian Andes. *Joint Meeting of R. Soc. Trop. Med. Hyg., Brit. Soc., Parasitol. & Am. Soc. Trop. Med. Hyg*. Oxford, England

Gray GC, Johnson AA, Thornton SA, Smith WA, Knobloch J, Kelley PW, Obregon Escudero L, Arones Huayda M & Wignall FS. (1990). An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. *Am J Trop Med Hyg*. Mar; 42(3):215-21.

Guimaraes D. L, Villafane M. G. & Maguiña C. (2006). Complicaciones ginecoobstétricas en la bartonellosis aguda: 50 casos observados en Caraz, Ancash. *Acta Med Per* 23(3)

Gupta RK, Robert LL & Lawyer PG. (2002). *Arthropods of Military Importance*. Kelley PK, Ed. Military Preventive Medicine: Mobilization and Deployment. The Textbook of Military Medicine. Washington, DC: The Borden Institute and The Surgeon General of the US Army, Wash., DC; pp 483-485

Hambuch T, Handley S, Ellis B, Chamberlin J, **Romero S**, & Regnery R. (2004). Population genetic analysis of *Bartonella bacilliformis* isolates from areas of Peru where Carrion's Disease is Endemic and Epidemic. *J Clin Microbiol*. Aug; 42 (8): 3675-3680.

Herrer A. & Christensen HA. (1975). Implication of *Phlebotomus* sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. *Science*. Oct 10; 190(4210): 154-5

Hertig, M. (1942). *Phlebotomus* and Carrión's Disease. *Supplement to Am. J. Trop. Med.* 22: 1-64

Hertig M. & Fairchild, G.B. (1948). The control of *Phlebotomus* in Peru with DDT. *Am J Trop Med Hyg.* 28, 207-230.

Houpikian P. & Raoult D. (2001). Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jun 12; 200(1)

Huarcaya, E, Chingaalayo E, Chávez JM, Chauca J, Llanos A, Maguiña C, Pachas P, & Gotuzzo E. (2004). Influencia del fenómeno de El Niño en la epidemiología de la bartonellosis humana en los departamentos de Ancash y Cusco entre 1996 y 1999. *Rev Med Hered* 15 (1)

Innis MA & Gelfand DH (1990). *Protocols*. Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.; Academic Press, New York.

Johnson G, Ayers M, McClure SC, Richardson SE & Tellier R. (2003). Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *J Clin Microbiol*. Mar; 41(3):1069-72.

Killick-Kendrick, R. & Ward, R.D. (1981). Ecology of the *Leishmania*. *Parasitol*.82: 143-152.

Knobloch, J., Solano, L., Alvarez, O. & Delgado, E. (1985). Antibodies to *Bartonella bacilliformis* as determined by fluorescence antibody test, indirect haemagglutination and ELISA. *Trop. Med. Parasitol.* 36:183-185

Kosek M, Lavarello R, Gilman R.H., Delgado J., Maguina C., Verastegui M., Lescano A.G., Mallqui V., Kosek J.C., Recavarren S. & Cabrera L. (2000). Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. *J. Infect. Dis* 182:865-872

Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR & Schmidt CA. (2000). Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using the TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol and Cell Probes*; 14:57-60.

Latorre C.R., Rogers E., **Romero S.E.**, & Fernandez R. (1989). Recovery of *Bartonella bacilliformis* from cryopreserved *Lutzomyia verrucarrum* and *L. peruensis* (Diptera: Psychodidae) *38th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 10-14 Dic. Honolulu, Hawaii.

Lawyer P.G. & Perkins P.V., (2000). *Leishmaniasis and Trypanosomiasis*. Eldridge BF & Edman JD eds. Textbook of Medical Entomology, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 231-298.

Maguiña, C. (1998). *Bartonellosis o Enfermedad de Carrion, nuevos aspectos de una vieja enfermedad*. A.F.A. Editores Importadores. Lima, Peru

Mallqui, V., Speelman, E., Verastegui, M., Maguina, C., Pinell-Salles, P., Lavarello, R., Delgado, J., Kosek, M., **Romero, S.**, Arana, Y., & Gilman, R. (2000). Sonicated diagnostic immunoblot for bartonellosis *Clin Diagn Lab Immunol* 7:1-5

McPherson, M. J. & Moller S.G. (2000). *PCR*. Springer-Verlag New York.

Ministerio de transporte y comunicaciones (MTC) Dirección General de Caminos y Ferrocarriles Dirección de Caminos. (2017). Recuperado de: http://www.mtc.gob.pe/transportes/caminos/normas_carreteras/Mapas%20De partamentales/08-CUSCO.pdf

MINSa (Ministerio de Salud, Peru) Tarazona A., (2006) Norma Técnica No 48 - MINSa / DGSP – V.01 Atención de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrion en el Peru. Recuperado de: http://www.dge.gob.pe/bartonella/NTS_048_RM_647_2006_BARTON.pdf

Norman, AF, Regnery, R., Jameson, P., Greene, C. & Krause, D.C. (1995). Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCRrestriction

fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* 33 (7), 1797-1803

Pachas P. (2000). *La Bartonellosis en el Peru*. Oficina General de Epid. INS Modulo Tecnico Lima

Padmalayam I, Fiskus W, Massung RF & Baumstark BR. (2003). Molecular cloning and analysis of a region of the *Bartonella bacilliformis* genome encoding *NlpD*, L-isoaspartyl methyltransferase and *YajC* homologs. *DNA Cell Biol.* May; 22(5):347-53

Riegelman R. K. & Hirsch R. P. (1995). *Como estudiar un estudio y probar una prueba lectura crítica de la literatura médica*. OPS Publicación Científica No. 531

Rolain JM, Franc M, Davoust B, & Raoult D. (2003). Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* Mar; 9(3):338-42

Romero S. (2005) INS. Biblioteca virtual en Salud. PCR en Tiempo Real y su Aplicación en la Enfermedad de Carrión. Recuperado de: <http://www.bvs.ins.gob.pe/print/carrion/ppt/16.pdf>

Sobraques M., Maurin, M., Birtles, R. J., & Raoult, D. (1999). In vitro susceptibilities of four *Bartonella bacilliformis* strains to 30 antibiotic compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2090-2092

Svobodova M., Votypka J., Nicolas L. & Volf P. (2003). *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes Infect.* Apr; 5(5):361-4

Tejada A, Vizcarra H, Perez J, Caceres A, Quispe J, Pinto J, Zorrilla V, Suarez A & Picon L. (2003). Estudio clinico epidemiologico de bartonelosis humana en el valle del Monzon, Huamalies, Huanuco. *Anales Fac. Med. Univ. Nac. Mayor San Marcos* Vol.64, (4):211-7.

Torgeson DG, Lampo M, Velazquez Y & Woo PT. (2003). Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* Nov; 69(5):484-93

Trager, W & Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675.

Velho PE, Cintra ML, Uthida-Tanaka AM, de Moraes AM & Mariotto A. (2003). What do we (not) know about the human bartonelloses? *Braz J Infect Dis*. Feb; 7(1): 1-6

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J & Wallace RB. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* 10 (3):233-238.

Young D.G. & Duncan M.G. (1994). Guide to the identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 1-881.

Zeaiter Z., Fournier P.E., Greub G. & Raoult D. (2003). Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol*. Mar; 41(3):919-25.

Zhou J., Lau W.K, Masuoka P., Andre R.G., Chamberlin J., Lawyer P., Laughlin L.W. (2002). El Nino helps spread bartonellosis epidemics in Peru. *EOS Trans Am Geophysical Union* 83: 157, 160-161.